

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU
LESPEDEZA CAPITATA Michx. ;
LÉGUMINEUSE A FLAVONOÏDES.

THÈSE

pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le . . juin 1962

PAR

Alain CHARLES

PHARMACIEN

Président M. R. PARIS,

Examineurs . . { M. G. DILLEMANN, *Professeur*
M. P. DELAVEAU, *Maître de Conférences*

PARIS
ÉDITIONS ANDRÉ LESOT
1962

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU
LESPEDEZA CAPITATA Michx. ;
LÉGUMINEUSE A FLAVONOÏDES.

THÈSE

pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue le . . juin 1962

PAR

Alain CHARLES

PHARMACIEN



Président..... M. R. PARIS,

Examineurs.. { M. G. DILLEMANN, *Professeur*
M. P. DELAVEAU, *Maître de Conférences*

PARIS
ÉDITIONS ANDRÉ LESOT
1962

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

- MM. G. VALETTE, Doyen, *, Q C.
 M. M. JANOT, Assesseur, *, Q C.
 L. RODINEAU, Secrétaire général, *, Q I.
 L. JEANDEL, Secrétaire général adjoint, Q, I.
 Mme S. CERTAIN, Secrétaire, Q I.
 Mme M. L. ESPINASSE, Secrétaire, Q I.
 M. G. FROISSART, Secrétaire, Q.

DOYEN HONORAIRE

- M. René FABRE, C *, Q C, Membre de l'Institut.

PROFESSEURS HONORAIRES

- MM. René FABRE, C *, Q C., Membre de l'Institut.
 DELEPINE, C *, Q C, Membre de l'Institut.
 LAUNOY, O *, Q I.
 FLEURY, O *, Q I.
 MASCRÉ, O *, Q C.
 PICON, O *, Q I.
 BEDEL, *, Q I.

PROFESSEURS

- | | | |
|------|----------------------------|--|
| MM. | M. M. JANOT, *, Q C | Pharmacie galénique (T.). |
| | G. VALETTE, *, Q C. | Pharmacodynamie (T.). |
| | R. PARIS, *, Q I. | Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.). |
| | M. GUILLOT, *, Q I. | Physique (T.). |
| | J. GAUTIER, *, Q I. | Chimie organique (T.). |
| Mlle | S. LAMBIN, *, Q I. | Microbiologie (T.). |
| MM. | Y. RAOUL, *, Q I. | Physiologie (T.). |
| | J. COURTOIS, *, Q I. | Chimie biologique (T.). |
| | L. DOMANGE, Q, Q I. | Chimie minérale (T.). |
| | P. CRÉTÉ, *, Q I. | Botanique (T.). |
| | R. TRUHAUT, O *, Q I. | Toxicologie et Hygiène industrielle (T.). |
| | A. MORETTE, *, Q I. | Hydrologie (T.). |
| | R. CAVIER, Q I. | Parasitologie (T.). |
| | A. QUEVAUVILLER, Q I. | Hygiène et Education sanitaire (T.). |
| | R. MOREAU, *, Q I. | Pharmacie chimique (T.). |
| | J. GUY, Q I. | Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.). |
| | A. GERMAN, Q I. | Virologie et Sérologie (T.P.). |
| | M. PIETTE, Q I. | Biologie sanguine (T. P.). |
| | P. MALANGEAU, Q A. | Chimie analytique (T.). |
| | M. GIRARD, Q I. | Chimie appliquée à l'expertise (T.). |
| | G. DILLEMANN | Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.). |
| | G. DEYSSON, Q I. | Cytologie végétale (T.P.). |
| | J. FLAHAUT, Q A. | Minéralogie (T.P.). |
| | C. BOUDENE | Professeur sans chaire. |
| | A. LE HIR | Professeur sans chaire. |
| | J. RENAULT, Q I. | Professeur sans chaire. |

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	Y. COHEN	Sciences naturelles.
	P. LARUELLE	Physique.
	G. LE MOAN	Toxicologie.
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie.
	H. RENAULT, Q A	Pharmacie chimique.
	C. PAOLETTI	Sciences appliquées.
	A. MANGEOT, Q I	Chimie analytique.
	P. DELAVEAU	Matière médicale.
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques.
	J. POISSON	Sciences naturelles.
	A. DESVIGNES, Q A	Microbiologie.
	F. PERCHERON	Biochimie.
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie.
	P. GESTEAU, *, Q I	Physique biologique.
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section biologie).
	J. HARIPSE Q I	Chimie générale et pharmaceutique.
	J. HENRY	Chimie (4 ^e année).
Mme	J. HUBERT	Microbiologie.
MM.	R. LELUC	Microbiologie.
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année).
Mlle	S. LONGUEVALLE, Q I	Service des examens de Chimie.
MM.	F. PELLERIN	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année).
	R. PERLES (F. Fonc.)	Chimie biologique.
	J. PESTIS (F. Fonc.)	Biologie animale.
	R. POUILLAIN	Hématologie.
	J. RIVET (F. Fonc.)	Physique.
Mme	M. ROBERT	Sérologie.
Milles	A. ROLLEN, *, Q A	Biologie végétale.
	L. SEGUIN (F. Fonc.)	Analyse appliquée au Contrôle des Médicaments (Section physico-chimique).
Mme	M. SEILLER (F. Fonc.)	Pharmacie galénique industrielle.
M.	J. YONGER (F. Fonc.)	Chimie analytique (1 ^{re} année).

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVÉ	Chef de travaux de pharmaco-technie galénique.
Mlle	H. MORIN, Q A	Chef de travaux de pharmaco-dynamie.
M.	ROBBA	Chef de travaux de pharmaco-technie chimique.

BIBLIOTHEQUE

Mlle	Y. RUYSSSEN, *, Q I	Conservateur, chargée de la Direction.
Mlle	LAVAUD, Q I	Conservateur.
Mmes	DESGRIPPES, Q I	Bibliothécaire.
	KREHMER, Q I	Bibliothécaire.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PARIS

*Professeur de Matière Médicale
à la Faculté de Pharmacie de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur*

Qui m'a fait le grand honneur de diriger mes travaux et de
présider le Jury de cette Thèse.

Témoignage de profonde gratitude et de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. DILLEMANN

*Professeur de Législation,
Déontologie et Histoire de la Pharmacie
à la Faculté de Pharmacie de Paris*

Qui a accepté de juger ce travail.
Témoignage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR *P. DELAVEAU*
Maître de Conférences

Qui a bien voulu s'intéresser à ce travail.
Avec ma reconnaissance très sincère.

A MONSIEUR ET MADAME *Claude CERVELLÈ*
Pharmaciens

Grâce auxquels j'ai pu réaliser ce travail.

En témoignage de ma reconnaissance et de mon amitié.

A ma Femme,

A mes Grands-Parents,

A mes Parents,

A toute ma famille,

A mes Amis,

Avec toute mon affection.

PLAN DU TRAVAIL

	Pages
INTRODUCTION	15
I. Première Partie : ÉTUDE BOTANIQUE	
CHAPITRE PREMIER. — A. Le genre <i>Lespedeza</i>	17
B. Les différentes espèces de <i>Lespedeza</i>	27
CHAPITRE II. — L'espèce <i>Lespedeza capitata</i> Michx.	34
CHAPITRE III. — Travaux personnels : étude anatomique du <i>Lespedeza capitata</i> Michx.	41
II. Deuxième Partie : ÉTUDE CHIMIQUE	
CHAPITRE PREMIER. — Travaux chimiques antérieurs	47
CHAPITRE II. — Travaux personnels : Essais préliminaires	54
CHAPITRE III. — Evaluation colorimétrique des dérivés flavoniques..	60
CHAPITRE IV. — Extraction des dérivés flavoniques	63
I. A partir de la plante fraîche	63
II. A partir de la plante sèche	66
CHAPITRE V. — Etude et purification des flavonoïdes bruts	71
CHAPITRE VI. — Etude du flavonoïde principal ou « lespécapitoside ».	78
I. Propriétés physiques.	78
II. Propriétés chimiques	83
CHAPITRE VII. — Etude des autres flavonoïdes du <i>Lespedeza capitata</i> Michx.	91
III. Troisième Partie : ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE	
CHAPITRE PREMIER. — Emploi des <i>Lespedeza</i> en médecine populaire et travaux antérieurs	95
CHAPITRE II. — Travaux personnels : Essais de toxicité	96
Action du lespécapitoside sur :	
Pression artérielle	98
Perméabilité et résistance des capillaires	100
Coagulation du sang	104
Diurèse	105
Cholérèse.....	106
Intestin isolé	108
CONCLUSIONS	109
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	113

INTRODUCTION

En 1939, des auteurs japonais ont séparé d'un *Lespedeza* asiatique, le *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. un dérivé flavonique cristallisé : la « Lespédine ».

Ayant pu disposer d'une espèce américaine, le *Lespedeza capitata* Michx., nous en avons entrepris l'étude. Elle paraissait intéressante puisque, en 1953, Monsieur le Professeur HALPERN avait mis en évidence l'action favorable de cette drogue dans les néphrites expérimentales du Lapin; où elle provoquait une baisse notable de l'azotémie.

D'autre part, Monsieur le Professeur LOEPER avait constaté, au point de vue clinique, une baisse de la teneur du cholestérol sanguin chez des malades athéromateux.

Il importait donc de rechercher si les principes actifs appartenaient aussi aux flavonoïdes, substances qui ont pris ces dernières années une réelle importance en thérapeutique et qui ont déjà fait l'objet au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie de Paris de nombreuses publications de Monsieur le Professeur R. PARIS et de ses élèves ; c'est donc dans cette voie que m'orienta le Professeur R. PARIS.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, je tiens à le remercier très sincèrement et très vivement d'avoir bien voulu m'accueillir au Laboratoire de Matière Médicale. Sa grande expérience scientifique m'a permis de mener mon travail à son terme et sa patiente sollicitude a été souvent pour moi un précieux encouragement.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour le très grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le Jury de cette Thèse.

Que Monsieur le Professeur G. DILLEMANN, qui a bien voulu faire partie du Jury de cette Thèse, soit assuré de ma respectueuse reconnaissance pour ses conseils qui m'ont été précieux.

A Monsieur P. DELAVEAU, Maître de Conférences, qui a accepté de juger ce travail, j'adresse mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il m'a toujours témoigné.

Madame H. MOYSE, Assistante de la Chaire de Matière Médicale a été pour moi un guide de tous les instants. Elle m'a pro-

digné les conseils de sa compétence étendue et m'a aidé dans la rédaction de ce travail ; je tiens à l'en remercier et la prie de croire à ma sincère reconnaissance.

J'assure de ma très vive gratitude Monsieur et Madame Claude CERVILLE, Pharmaciens, qui m'ont fourni la matière première de ces recherches, ont permis la réalisation de ce travail et ont pris entièrement à leur charge l'impression de cette Thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur R. WEITZ, Assistant honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris. J'ai trouvé auprès de lui un accueil toujours bienveillant et le secours de son érudition dans le domaine de la bibliographie.

J'assure de ma reconnaissance tout ceux qui, au Laboratoire de Matière Médicale, m'ont aimablement aidé : mes camarades A. STAMBOULI, Docteur en Pharmacie, Ingénieur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique et J.-P. THÉALLET, Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris, toujours disposés à me faire profiter de leurs conseils et de leur pratique du laboratoire ; Monsieur A. DANGEARD, aide technique de Matière Médicale dont l'aide efficace a facilité nombre d'opérations d'extractions longues et délicates et qui n'a jamais ménagé son temps quand je me suis adressé à lui ; Madame R. PORTOUX et Mademoiselle F. GOGLIN, attachées au Laboratoire de Matière Médicale.

Je ne saurais non plus oublier l'aide qui m'a été apportée par mon ami P. CHAUMELLE, Pharmacien, pour l'étude anatomique, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mes remerciements.

J'assure enfin de mon amicale sympathie tous les camarades que j'ai rencontrés au laboratoire au cours de ces années d'études.

Monsieur BEAUVILLAIN, Docteur ès-sciences, et le Docteur Vétérinaire JACOB ont bien voulu me prêter leur concours pour les essais pharmacodynamiques, qu'ils en soient remerciés.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BOTANIQUE

CHAPITRE PREMIER

A) LE GENRE *LESPEDeza*

En 1803, A. MICHAUX [102] créa (1), pour quatre herbes ou sous-arbrisseaux originaires de l'Amérique du Nord, le genre *Lespedeza* (2) dédié à Don LESPEDEZ, Gouverneur espagnol de la Floride qui l'avait aidé dans ses voyages. Pour M. L. FERNALD [51] ce Gouverneur répondait en réalité au nom de VINCENTE MANUEL DE CESPÈD, nom que vraisemblablement, l'éditeur de MICHAUX orthographia mal, le déformant en DE LESPEDEZ.

MICHAUX rattacha ce nouveau genre à la famille des Légumineuses, sous-famille des Papilionacées, tribu des Hédysarées, caractérisée par ses étamines diadelphes et ses fruits monospermes, ou divisés en articles monospermes.

Voici d'ailleurs la diagnose qu'il donne du genre *Lespedeza* :

Caulis fruticosus ; Folia trifoliata aut rara simplicia.

Cal. 5-partitus, laciniis, subaequalibus lineari, lanceolatis seu subulatis.

Cor. } *Hedysari*
Stam. }

Pist. Ovarium breviter stipitatum compresso subovatum, styliis capillaris, stigma conoïdes capitatum.

Leg. pusillum lenticulare, monospermum.

Il range dans ce nouveau genre quatre espèces, dont trois semblent déjà avoir été décrites, mais rattachées à d'autres genres : le *Lespedeza sessiliflora* de MICHAUX correspond au *Medicago virginica*

(1) En fait l'édition originale de la *Flora boreali americana* parut en 1803, après la mort de MICHAUX ; publiée par son fils F. A. MICHAUX [147] elle a été rédigée par L.C.M. RICHARD [27, 145], aussi certains auteurs comme ENDLICHER [48] indiquent par erreur ce dernier comme créateur du genre *Lespedeza*.

(2) On trouve également *Lespedezia* [143].

de LINNÉ et à l'*Hedysarum junceum* de WALTER ; le *Lespedeza polystachya* est le « sainfoin velu » de LINNÉ (= *Hedysarum hirtum*) et le *Lespedeza capitata*, le *Lotus* de GRONOVIVS. Seul le *Lespedeza procumbens*, de Virginie et Caroline paraît nouveau.

Historique

Ainsi certaines espèces qui devaient être ultérieurement rangées dans le genre *Lespedeza* avaient déjà été décrites : si nous en croyons GRONOVIVS [63], PLUKENET [140], dès 1700 décrit un « *Lotus* à feuilles trifoliolées, frutescent, glabre », qui serait le *Lespedeza capitata* d'après SCHINDLER [156], et pour MAXIMOVICZ [98] le *Lespedeza reticulata*.

En 1739, GRONOVIVS présente 6 espèces provenant des collections que Jean CLAYTON, naturaliste anglais, recueillit en 1705 lors de son voyage botanique en Virginie. Il les classe dans les genres *Lotus* (*Lespedeza capitata* Michx.) ; *Medicago* (*Lespedeza stuvei* Nutt. et *Lespedeza reticulata* Pers.) ; *Hedysarum* (*Lespedeza repens* Barton, et *Lespedeza violacea* Pers.) et *Trifolium* (*Lespedeza polystachya* Michx.).

La même année AMMAN [7] donne la description d'un *Hedysarum*, originaire de Sibérie orientale (*Lespedeza juncea* Pers.). LINNÉ en 1753 [93] rattache aussi aux genres *Medicago* et *Hedysarum* des espèces qui seront reconnues ultérieurement comme *Lespedeza* (*Lespedeza reticulata* Pers., *Lespedeza violacea* Pers., *Lespedeza polystachya* Michx., et *Lespedeza repens* Barton).

Le *Trifolium* de Sibérie décrit en 1771 par LAXMANN [89] semble être le *Lespedeza trichocarpa* Pers. et ceux de PALLAS [121] les *Lespedeza juncea* Pers. et *Lespedeza trichocarpa* Pers.

THUNBERG en 1784 [176] accrut notre connaissance des futurs *Lespedeza* par la description d'espèces japonaises rangées par lui dans les *Hedysarum* (*Lespedeza villosa* Pers., *Lespedeza juncea* Pers., *Lespedeza virgata* D.C., *Lespedeza pilosa* Sieb. et Zucc.).

Le *Medicago* et les deux *Hedysarum* dont parle LAMARCK [88] en 1789 et 1795 paraissent être les *Lespedeza reticulata* Pers., *Lespedeza violacea* Pers., et *Lespedeza capitata* Michx.

Enfin, en 1803, WILLDENOW [190] classe aussi plusieurs *Lespedeza* parmi les *Hedysarum*.

Ainsi une douzaine d'espèces, reconnues ultérieurement comme des *Lespedeza*, étaient réparties à la fin du XVIII^e siècle dans différents genres (*Lotus*, *Medicago*, *Trifolium*, *Hedysarum*), d'où les nombreuses synonymies relevées.

Après la création du genre par MICHAUX de nombreux auteurs : PERSOON [134], BUNGE [28], CAMBESSÈDES [30], BENTHAM [16] et MIQUEL [103] entre autres vont, à partir de 1825, augmenter rapidement par leurs travaux le nombre des espèces de *Lespedeza*.

BUNGE envisagea d'en séparer un genre voisin qu'il nomme *Campylotropis* et qui groupe les espèces à carène infléchie, acuminée.

Cependant le genre *Lespedeza* restait encore mal défini en 1870 et le nombre d'espèces proposées s'élevait à 63. Ce fut alors que MAXIMOWICZ [98] montra que ce nombre était beaucoup trop élevé et il le réduisit à 32 espèces vraies. De même que BENTHAM, il place le genre *Lespedeza* entre les *Hedysarum* et les *Desmodium* et, comme lui, il considère les *Campylotropis* comme un sous-genre des *Lespedeza*. MAXIMOWICZ propose d'ailleurs deux autres subdivisions :

Les *Lespedeza* proprement dits, à fleurs toutes pétalées, carène droite, obtuse ou tronquée.

Les *Microlespedeza*, caractérisés par la présence d'un grand nombre de fleurs apétales et par la rareté des fleurs pétalées.

MAXIMOWICZ divise encore le sous-genre *Lespedeza* en 2 sections :

Les *Macrolespedeza* totalement dépourvus de fleurs apétales.

Les *Eulespedeza* qui en comptent quelques-unes.

Et, de fait, il est assez difficile d'identifier les espèces car les *Lespedeza* sont tous plus ou moins polymorphes ; cependant, la forme des feuilles, la taille et la coloration de la corolle, la forme du calice, sa nervation, ses rapports avec les pétales, peuvent fournir des éléments de diagnose satisfaisants.

En 1891, H. BAILLON dans son Dictionnaire de Botanique [12] range ce genre dans la série des Hédysarées, sous série des Desmodiées, se distinguant par :

- les deux lobes supérieurs du calice en grande partie soudés ;
- la carène, incurvée, obtuse ou en forme de bec ;
- l'ovaire uni ovulé ;
- le style, grêle, incurvé ;
- la gousse presque sphérique ou ovale, réticulées et un peu comprimée, indéhiscente.

Après MAXIMOWICZ, grâce aux travaux de nombreux auteurs dont nous ne citerons que quatre principaux : FRANCHET [55], SCHINDLER [155, 156], NAKAI [109] et RICKER [148, 149], le genre *Lespedeza* continua de s'accroître jusqu'à nos jours, et l'on compte actuellement plus de cent cinquante espèces.

Les synonymes du genre sont :

Campylotropis Bunge, Pl. Monghol. Chin. 6 (1835) [28].

Oxyramphis Wall., Cat. n. 5348 (1831), [183].

Phlebosporium Jungh., Reise 346 (1845), [84].

Description du genre

Les *Lespedeza* sont des herbes, sous-arbrisseaux ou arbrisseaux répandus en Amérique du Nord, Asie tempérée et Australie.

Ils sont parfois annuels (*Lespedeza striata* Hook. et Arn.) mais la plupart du temps vivaces ; on signale [135] certaines espèces vivaces, qui, cultivées, semblent devenir annuelles comme le *Lespedeza sericea* Benth. en Amérique du Nord (Illinois).

Les feuilles composées pennées, sont trifoliolées, rarement unifoliolées, parfois presque palmées [91], bistipulées.

BLAKE [19] signale deux spécimens du *Lespedeza leptostachya* Engelm. du National Herbarium portant une feuille quadri-foliolée et une feuille penta-foliolée.

Les folioles, entières, sont de forme variable, sans stipelles :

- ovales-obtuses (*Lespedeza bicolor* Turcz.) ;
- ovales arrondies (*Lespedeza delavayi* Franch.) ;
- allongées (*Lespedeza trigonoclada* Franch.) ;
- elliptiques (*Lespedeza macrocarpa* Bunge) ;
- étroites, en spatules tronquées (*Lespedeza sericea* Benth.).

Leur taille varie de 0.5 à 3.5 cm pour la largeur et atteint 5 cm et plus pour la longueur.

Elles sont glabres ou duvetées, soyeuses ou rêches, luisantes, blanchâtres, ou d'un vert plus ou moins foncé, caractères différentiels importants pour la distinction des espèces et variétés.

FOURNIER [54] distingue : des tiges et des rameaux cylindracés (*Lespedeza bicolor* Turcz., *L. sieboldi* Miq., *L. sericea* Benth., *L. macrocarpa* Bunge, etc...) et des tiges et des rameaux triangulaires par décurrence des stipules (*Lespedeza trigonoclada* Franch.).

Les fleurs, petites, sont nombreuses en général (le *Lespedeza reticulata* D.C. est pauciflore). Elles sont groupées en inflorescences variables : grappes, panicules axillaires ou terminales, plus rarement en capitules.

Les bractées sont petites, on compte deux bractéoles.

Les fleurs sont parfois rouges (*Lespedeza juncea* Pers.), rose pourpre (*Lespedeza bicolor* Turcz.), violettes (*Lespedeza reticulata* D.C.) mais jaunâtres ou blanchâtres le plus souvent.

On trouve souvent chez les *Lespedeza* des fleurs de deux sortes mélangées [95], les unes pétalifères et souvent stériles, les autres, plus petites, apétales et fertiles ; HANSON [66, 67], étudiant la cléistogamie et le développement du sac embryonnaire du *Lespedeza stipulacea* Maxim., trouve que la proportion des fleurs pétalées est déterminée, presque exclusivement, par les facteurs extérieurs, la température et la longueur du jour étant les plus importants.

Le calice est divisé en 4 ou 5 lobes subulés presque égaux, les deux supérieurs étant soudés chez les fleurs stériles, lancéolées linéaires chez les fleurs fertiles ; il est campanulé ou tubuleux. La corolle a des pétales onguiculés saillants, l'étendard large, obovale ou oblong est à peine auriculé, les ailes oblongues un peu

adhérentes à la carene, celle-ci plus ou moins courbée et rostrée est aiguë ou obtuse [92].

L'androcée est diadelphé (9+1) les anthères sont uniformes. l'étamine vexillaire est presque toujours libre jusqu'à la base.

L'ovaire est sessile ou courtement pédonculé, uni-ovulé.

Le style est long, en alène, grêle, incurvé, le stigmate capité, petit.

Le fruit est une gousse, non incluse dans le calice, petite, oblongue, aplatie, comprimée, monosperme, souvent réticulée, non articulée (ce qui oppose les *Lespedeza* aux *Desmodium* qui ont des gousses articulées) ; on rencontre parfois une sorte de petit prolongement pédonculé à la base de la gousse ; la graine est arrondie à ovale, comprimée, non arillée, les cotylédons sont un peu émarginés près du hile.

Nous adopterons pour le genre *Lespedeza* la classification que donne TAUBER dans ENGLER [175].

SECTION I : *Archilespedeza* (Taub.).

— Présence de deux fleurs derrière chaque bractée.

— Préfeuilles : une à la base du pédicelle floral, deux persistantes sous le calice.

Fleurs en grappe ou en épis.

A) *Macrolespedeza*, à grosses fleurs.

B) *Eulespedeza* : fleurs petites à moyennes, fleurs apétales à la base de l'inflorescence.

B* - *violacea*

B* - *juncea*.

B - *Lespedezarietes* : Corolle jaune pâle avec quelques points violets, calice 1/3 plus court, rarement plus long.

Arbustes dressés. Le *Lespedeza capitata* de MICHAUX se situe dans cette dernière catégorie.

SECTION II : *Campylotropis* (Bge).

— Présence d'une fleur derrière chaque bractée.

— Préfeuilles : deux sous le calice, tombant précocement.

— Fleurs en grappes, complètes.

SECTION III : *Microlespedeza* (Maxim.).

— Nombreuses fleurs apétales mélangées aux autres, par une ou par trois.

— Nombreuses bractées et préfeuilles.

— Feuilles longuement ciliées.

Cytologie du genre *Lespedeza*

Plusieurs auteurs américains ont étudié la cytologie de ce genre [37, 44, 136, 195].

Le nombre de chromosomes des gamètes, observé chez la plupart des *Lespedeza* est de neuf ou dix, mais comme on trouve toujours vingt chromosomes dans l'extrémité de la racine à la métaphase, le nombre gamétique est en fait de dix.

La longueur des chromosomes varie de un à trois microns : les grains de pollen montrent des variations de taille chez les hybrides des différentes espèces de *Lespedeza*, mais on ne remarque pas d'anomalies caryologiques.

Nombre de chromosomes de quelques espèces :

18 chromosomes : *L. homoloba* Nakai ; *L. sericea* Benth. ; *L. sieboldii* Miq.

18 ou 20 chromosomes (selon les auteurs) : *L. juncea* Pers.

18 ou 22 chromosomes (selon les auteurs) : *L. bicolor* Turcz. et *L. cyrtobotrya* Miq.

20 chromosomes : *L. capitata* Michx. ; *L. pilosa* Sieb. et Zucc. ; *L. striata* Hook. et Arn. ; *L. repens* Barton ; *L. stuvei* Nutt. ; *L. villosa* Pers. ; *L. reticulata* Pers.

22 chromosomes : *L. floribunda* Bunge ; *L. japonica* Bailey ; *L. virgata* D.C. ; *L. striata* Hook. et Arn.

Pollinisation dans le genre *Lespedeza*.

GRAETZ [62] pense que le *Lespedeza bicolor* Turcz. et les autres espèces de *Lespedeza* vivaces ne peuvent pas être auto-fécondés.

Les insectes jouent un rôle important dans la pollinisation, les abeilles sauvages sont plus actives pollinisatrices que les abeilles domestiques.

C. ROBERTSON [150] a étudié la pollinisation du *Lespedeza capitata* Michx. en relation avec la forme des pièces florales ; le point violacé sur l'étendard dans les fleurs blanches attire les insectes, les ailes et la carène sont affaissées ensemble et retournent à leur position en recouvrant les étamines et le pistil, la courbure de l'étendard est si forte qu'il faut un proboscis d'au moins trois à quatre millimètres de long pour atteindre le nectar. La saison de la floraison aux Etats-Unis se situe du 14 août au 10 septembre. ROBERTSON a vu les fleurs du *Lespedeza capitata* Michx. visitées par les deux abeilles suivantes : *Megachile brevis* Say. et *Calliopsis andreniformis* Sm.

EMPLOIS DES *LESPEDEZA*

Horticulture

Certaines espèces de *Lespedeza* sont des plantes ornementales, à fleurs pourpres, roses, blanches ou violettes : *L. bicolor* Turcz.,

L. japonica Bailey, *L. sieboldi* Miq. Les *Lespedeza sieboldi* et *L. japonica* qui fleurissent abondamment et fournissent des fleurs tard en saison, jusqu'au mois d'octobre, sont particulièrement utilisés aux Etats-Unis [10]. Ces espèces sont de culture facile. Au Japon on trouve souvent dans les jardins *L. bicolor* Turcz. originaire de Chine que l'on rencontre également [99] à l'état sauvage dans les forêts montagneuses et les vallées des îles de Kiusiu, de Nippon, de Yeço.

Il ne semble pas qu'en Europe les essais d'acclimatation vers la fin du XIX^e siècle aient donné de très bons résultats, cependant le *Lespedeza sieboldi* figure encore dans certains catalogues horticoles.

Agriculture et élevage

Les *Lespedeza* sont utilisés pour l'amélioration des sols et leur conservation [138], c'est ainsi que le *Lespedeza striata* Hook. et Arn. est susceptible d'entrer en assolement avec le Cotonnier [6].

D'autre part, ces plantes, très peu exigeantes, peuvent vivre sur des sols que l'érosion a rendus impropres à la culture [68]. Ainsi dans les Etats du Sud de l'Amérique boréale des centaines d'hectares de terres improductives sont récupérables grâce à l'introduction du *Lespedeza*. Parmi les espèces cultivées le *Lespedeza sericea* Benth. importé de l'Inde en 1921, à croissance rapide et qui fournit un excellent fourrage, paraît être un des plus appropriés à la reconstitution des terres appauvries [11, 137] et à l'amélioration des sols [52]. Il est d'un bon rendement sur les sols les plus ingrats, là où la Luzerne et le Trèfle ne sont d'aucun rapport [135]. Le *Lespedeza cuneata* G. Don désigne le plus souvent, aux Etats-Unis, le *Lespedeza sericea* Benth., cependant le terme *sericea* est encore utilisé [47].

On cultive également en Amérique le *Lespedeza striata* Hook. et Arn. avec deux variétés, Kobe et Tennessee [138]. Cette espèce de la région méridionale des Etats-Unis est surtout utilisée pour ses graines, G. WATT [185] précise que le *Lespedeza striata* (« Japan Clover ») se contente de tous les sols, argileux ou sablonneux, secs ou humides (5 tonnes de fourrage à l'hectare).

Quant au *Lespedeza stipulacea* (« Korean Lespedeza ») originaire de Corée, introduit en 1921, il ne figure pas à l'Index de Kew comme espèce vraie, mais comme synonyme du *L. striata* Hook. et Arn.

Pourtant, il est très souvent cité dans la littérature ; en particulier PIETERS et VAN ESELTINE le décrivent [139] comme présentant des rameaux plus ligneux, des folioles plus grandes et d'un vert plus sombre que *L. striata*. Il a en outre, d'après ces auteurs, une croissance plus rapide et ses fleurs et ses graines

apparaissent deux semaines plus tôt, ce qui le fait cultiver dans des régions plus septentrionales que le *L. striata* type (Caroline du Nord, Tennessee, Kansas, Oklahoma).

Les variétés de culture sont : Iowa 81, Rowan, Climax, Harbin, Early Korean, Late Korean [189].

En 1952, F.J. CRIDER [42] décrivit une nouvelle variété du *Lespedeza bicolor*, lignée « Natob », qui donne également de bons résultats, pour la reconstitution des sols et accroît leur résistance à l'érosion.

De nombreux auteurs se sont occupés aux Etats-Unis de la culture des *Lespedeza* et ont étudié les nombreux problèmes qu'elle suscite tant au point de vue du laboratoire que de la culture proprement dite.

Nous citerons quelques travaux parmi les plus intéressants. Ils concernent : la tolérance des semis au froid [173] ; les différentes sortes d'engrais et de fertilisants [21, 78] ; la diversité des amino-acides de la plante en relation avec les engrais utilisés [158] ; la germination des graines [117] ; l'utilisation de litières de feuilles sèches et de paille soit pour faciliter cette germination, soit pour enrichir le sol [74, 83, 104] ; la culture des *Lespedeza* en relation avec les différents types de sol [106, 135, 144] ; les symptômes des carences en potassium et en phosphore [3, 20] ; la toxicité du manganèse [106, 120] ; les effets du calcium, du phosphore et du fer modifiant la tolérance des *Lespedeza* au manganèse [107] ; l'action du molybdène [151] et du bore [152] ; l'influence du chaulage et du phosphore sur le rendement de la plante [2]. Plusieurs auteurs insistent particulièrement [15, 115, 160, 177] sur l'importance du photopériodisme sur la croissance et la composition chimique des *Lespedeza* : chez plusieurs espèces, en particulier chez *Lespedeza sericea*, la durée optimum d'éclairement pour une floraison et une production de graine abondantes est d'environ treize heures ; par contre, il semble que le pourcentage de tanin augmente avec la durée d'éclairement.

Ainsi, depuis plusieurs années, certains *Lespedeza* sont devenus parmi les Légumineuses les espèces les plus cultivées comme pâturage et plantes fourragères dans les Etats du Sud des Etats-Unis [9]. Cependant, il faut remarquer que la teneur en cendres et en phosphore du *Lespedeza sericea* est plus basse que celle des fourrages classiques [76] et qu'ainsi les jeunes bovidés prospèrent moins vite qu'avec la Luzerne.

RUSOFF et SEATH [153] ont étudié la digestibilité des *Lespedeza* pour les bovidés en relation avec la teneur en protéines brutes et le stade de végétation. SWANSON et HERMAN, cherchant à définir la valeur nutritive en protéines du *Lespedeza stipulacea* estiment

que la qualité des protéines de ce fourrage est équivalente à celle du lait, de la Luzerne, du Maïs et probablement de l'huile de Soja, mais le foin est dur en raison de la texture des feuilles. Il est peu digeste et son utilisation comme tel oblige à le faucher jeune [170, 171].

Plusieurs *Lespedeza* sont aussi utilisés aux Etats-Unis pour leurs graines qui possèdent une valeur nutritive élevée due à leur richesse en protides comme l'ont montré BORCHERS et ACKERSON [22].

Le *Lespedeza stipulacea* est un grand producteur de graines [139]. En 1922, à la ferme expérimentale d'Arlington, les rangées étant distantes de 0,50 m, le rendement a été d'environ 1 tonne à l'hectare.

ECKEY [46], n'indique qu'un rendement de 500 kg pour le *Lespedeza striata*. La graine peut être utilisée avec profit comme appoint protéique, particulièrement pour la production du lait chez les vaches [77]. ACKERSON et MUSSEHL [1] proposent le remplacement de l'huile de Soja par des graines de *Lespedeza stipulacea* pour la nourriture des volailles. D'autres auteurs font également mention de l'utilisation des *Lespedeza* pour la nourriture du bétail [39] et des volailles [4]. En particulier, PATRICK et MORGAN [131] mettent en parallèle la teneur en riboflavine des feuilles d'Alfalfa et de *Lespedeza sericea* Benth. utilisées comme sources de cette vitamine pour l'élevage du Poulet.

Plusieurs auteurs signalent l'utilisation des *Lespedeza* dans la fabrication du papier. Au Japon, le docteur MÈNE [99], l'indiquait déjà en 1885 pour le *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. En 1950, BARKER, [13] propose de nouveau le *Lespedeza sericea* comme source de pâte à papier.

Signalons enfin [99] que le *Lespedeza bicolor* Turcz. est presque constamment représenté sur les porcelaines et les laques japonaises.

PARASITES DES *LESPEDEZA*

Les *Lespedeza* ayant une importance croissante dans l'agriculture des Etats-Unis, il semble intéressant de citer les principaux parasites qui s'attaquent aux espèces les plus cultivées.

VIRUS [8]

La Mosaïque de la Luzerne : *Medicago Virus I* (Weimer) Smith, sur le *Lespedeza striata* Hook. et Arn. aux Etats-Unis.

La Mosaïque du Haricot : *Phaseolus Virus I* (Pierce) Smith, parasite *L. striata*.

La Mosaïque jaune : *Phaseolus Virus II* (Pierce) Smith, également sur *L. striata*.

BACTÉRIES

Une bactérie aérobie Gram négatif : *Xanthomonas Lespedezae* (Ayers, Lefebvre et Johnson) a été observée sur *L. striata* [8].

Une autre bactérie pathogène a été isolée des feuilles de *Lespedeza* : *Pseudomonas stizobii* Wolf. [29].

CHAMPIGNONS

Parmi les Urédinées on trouve plusieurs espèces. Nous empruntons la classification de A.L. GUYOT [64] :

— *Uromyces rugulosus* (du type « Verrucosi ») sur *Lespedeza gunnanensis* Franch.

— *Uromyces Lespedezae* = *Uromyces procumbentis* (Schw.) (du type « Crassi ») sur *Lespedeza bicolor* Turcz. et *Lespedeza violacea* Pers.

— *Uromyces Lespedezae procumbentis* (Schw.) Curtis 1867 = *Uromyces macrosporus* (Thuem. 1880) sur de très nombreuses espèces de *Lespedeza* en Amérique boréale et en Asie Extrême orientale (Formose, Chine, Corée, Manchourie, Japon).

Uromyces DIVERS :

— *Uromyces itoanus* (Hiratsuka 1935) sur *Lespedeza striata* Hook. et Arn. [79].

— *Uromyces Lespedezae bicoloris* (Tai et Cheo 1937, sur le *L. bicolor* - Chine).

— *Uromyces Lespedezae macrocarpa* (Liou et Wang 1935). PIETERS et VAN ESELTINE [139] signalent que le *Lespedeza stipulacea* semble être plus sensible que *L. striata* aux attaques du *Sclerotium rolfsii* Sacc.

SEYMOUR [157] décrit l'*Aecidium leucosticum* parasitant diverses espèces de *Lespedeza*.

WEIMER [188] signale que le *Lespedeza striata* est plus sensible que le *Lespedeza stipulacea*, à l'anthracnose *Glomerella cingulata* ; une autre anthracnose : *Colletotrichum truncatum* parasitant également le *Lespedeza striata* [41].

PLANTES PARASITES :

La Cuscutte des champs (*Cuscuta pentagona*) parasite sérieusement les cultures de *Lespedeza* aux Etats-Unis [184]. STITT [163, 164] en particulier, étudie ce parasitisme et les moyens de le contrôler et d'y remédier.

INSECTES

Plusieurs insectes parasitent les *Lespedeza* parmi lesquels *Tetralopha scortealis* Led. [141] et *Aceratogallia sanguinolenta* Prov. [8].

B) LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *LESPEDEZA*

Le genre *Lespedeza* (1) Michx. renferme d'après l'Index Kewensis et ses suppléments actuellement parus (1953), les espèces suivantes ainsi réparties par régions.

Amérique du Nord

— Partie ouest des Etats-Unis.

Lespedeza acuticarpa Mackenzie et Bush., Fl. Jackson County, 118.

Lespedeza angustifolia Ell. Sketch, II, 206.

Lespedeza bicknellii House, in Torrey, V, 167.

Lespedeza brittonii E.P. Bickn. in Torrey, I, 103.

Lespedeza capitata Michx., Fl. Bor. Amer., II, 71.

syn. *L. frutescens* Ell. Sketch, II, 206.

L. fruticosa Pers. Syn., II, 318.

L. longifolia D.C., Prod., II, 349.

Lespedeza leptostachya Engelm. ex A. Gray, in Proc. Am. Acad. XII, 57 (1877).

Lespedeza manniana Mackenzie et Bush., Fl. Jackson County 118 et in Trans. Acad. Sci. St Louis XII, 15.

Lespedeza neglecta Mackenzie et Bush. in Trans. Acad. Soc. Sci. St Louis XII, 17.

Lespedeza oblongifolia Stone, Rep. N. Jersey St. Mus., 1910, 509 (1911)

= *Lespedeza hirta* var. *oblongifolia* Britton.

Lespedeza polystachya Michx. Fl. Bor. Amer. II, 71.

syn. *L. hirta* Ell. Sketch, II, 207.

Lespedeza prairea Britton in Small Fl. S.E.U.S., 641.

Lespedeza repens Barton, Prod. Fl. Philad. II, 77.

syn. *L. procumbens* Michx. Fl. Bor. Amer. II, 70.

L. prostrata Pursch. Fl. Am. Sept. II, 481.

Lespedeza reticulata Pers. Syn. II, 318.

syn. *L. angustifolia* Darl. Florul. Cest. 81 et Fl. Cest. Ed. I, 419.

L. frutescens D.C. Prod. II, 349.

L. sessiliflora Michx, Fl. Bor. Amer. II ; 70.

L. violacea Ell. Stetch, II, 205.

L. virginica (= *sessiliflora* Michx), Britton in Trans. N.Y. Acad. Sci. XII, 64 (1893).

Lespedeza sessiliflora Nutt. Gen. Am. II, 107.

Lespedeza simulata Mackenzie et Bush. in Trans. Acad. Soc. St Louis XII, 18.

(1) Conformément aux recommandations du VII^e Congrès de Botanique de Stockholm 1950, les initiales des épithètes scientifiques sont en minuscules (International Code of Botanical Nomenclature adopted by the 7th International Botanical Congress, Stockholm, juillet 1950, Utrecht 1952. Traduction française par Cl. BAEHNI).

Noms vernaculaires [59] : Allemagne : Japanischer Kleber ; Pays anglo-saxons : Hoop-Koop plant, Bush Clover ; France : Trèfle du Japon ; Pays-Bas : Japansche Klaver.

- Lespedeza stuvei* Nutt. Gen. Am. II, 107.
 syn. *L. nuttallii* Darl. Fl. Cestr. Ed. I, 420.
L. virgata Nutt. ex Darl. Fl. Cestr. Ed. I, 420.
- Lespedeza texana* Britton in Small Fl. S.E.U.S., 641.
- Lespedeza velutina* E.P. Bickn. in Toreya 1-102 (sept. 1901),
- Lespedeza villosa* Pers. Syn. II, 318.
 syn. *L. glomerata* Hornem. Hort. Hafn. suppl. 81.
L. hirta Hornem. Hort. Hafn. 699.
L. macrophylla Bunge Pl. Monghol. Chin. 10.
L. tomentosa Siebold ex Maxim. in Acta Hort. Petrop. II, 376 (1873).
- Lespedeza violacea* Pers. Syn. II, 318.
 syn. *L. divergens* Pursh. Fl. Am. Sept. 481.
L. frutescens Britton in Mem. Torrey Bot. Club, V, 205 (1894).
L. intermedia Britton, in Trans., N.Y. Acad. Sci. XII, 63 (1893).

Inde (Himalaya)

- Lespedeza dubia* Schindler in Fedde, Repert IX, 514 (1911).
- Lespedeza elegans* Cambess. in Jacquem. Voy. Bot. 43, t. 52.
- Lespedeza eriocarpa* D.C. in Ann. Sc. Nat. Sér. I, IV, 102 (1825).
 syn. *L. paniculata* Royle ex Maxim. in Act. Hort. Petrop. II, 349 (1873).
L. speciosa Royle ex Maxim. in Act. Hort. Petrop. II, 350 (1873).
- Lespedeza gerardiana* R. Grah. in Wall. Cat. n. 5744.
- Lespedeza indica* Schindler in Fedde, Repert IX, 515 (1911).
- Lespedeza juncea* Pers. Syn., II, 318 (1).
 syn. *L. argyracea* Sieb. et Zucc. in Abh. Akad. Muench. IV, II, 120 (1843).
L. cuneata G. Don, Gen. Syst., II, 307.
L. kanaorensis Cambess. in Jacquem. Voy. Bot. 42.
L. sericea Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 49.
L. variegata Cambess. in Jacquem. Voy. Bot. 42.
- Lespedeza meeboldii* Schindler in Fedde, Repert IX, 521 (1911).
- Lespedeza sericea* Benth. in Miq. Pl. Jungh. 227.
 syn. *L. macrostyla* Baker ex Maxim. 348 in Act. Hort. Petrop. II (1873).
L. royleana Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 50.
- Lespedeza sieboldi* Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 47.
 syn. *L. elliptica* Benth. ex Maxim. in Acta Hort. Petrop. II, 353, (1873).
- Lespedeza speciosa* Royle, Schlinder in Fedde, Repert IX, 519 (1911).
- Lespedeza stenocarpa* Maxim. in Acta Hort. Petrop. II, 349 (1873).
 syn. *L. sericea* Royle ex Maxim. in Acta Hort. Petrop. II, 349, (1873).
- Lespedeza thomsoni* Benth. ex Baker, in Hook. f. Fl. Brit., Ind., II, 144.

(1) Noms vernaculaires : Medo Hagí, Medo Fagi, Medo Ki, Ko Haki (Japon), [55, 97, 99].

Inde orientale

Lespedeza falconeri Prain. in Journ. As. Soc. Beng. LXVI, II, 376 (1897).

Asie boréale

Lespedeza juncea Pers. Syn., II, 318, [Id. Himalaya].

Afghanistan

Lespedeza aitchisoni Ricker in Lignan Sci. Journ. XX, 199 (1942).

Mongolie

Lespedeza potaninii Vassiliev, in Not. Syst. Herb. Inst. Bot. Acad. Sci. U.R.S.S., IX, 202 (1946).

Chine (1)

Lespedeza albiflora Ricker in Amer. Journ. Bot. XXXIII, 257 (1946). (Kwangtung)

Lespedeza angulicaulis Harms ex Schindler in Fedde, Repert IX, 522 (1911). (Yunnan)

Lespedeza anhweiensis Ricker in Lignan Sc. Journ. XX, 200, (1942). (Anhwei)

Lespedeza atrokermesina Forrest, ex W.W. Smith in Notes Bot. Gard. Edin., X, 44 (1917). (Yunnan)

Lespedeza balfouriana Diels ex Schindler in Fedde, Repert, IX, 522 (1911). (Yunnan)

Lespedeza bicolor Turcz. in Bull. Soc. Nat. Mosc. 69 (1840) (2).

Lespedeza blinii Leveillé in Bull. Géog. Bot. XXV, 48 (1915). (Yunnan)

Lespedeza bonatiana Pampan. in Nuov. Giorn. Bot. ital. XVII, 19 (1910).

Lespedeza bracteolata Ricker in Lignan Sci. Journ., XX, 201 (1942).

Lespedeza canescens Ricker in Lignan Sci. Journ., XX, 200 (1942). (Hupeh)

Lespedeza capillipes Franch. Pl. Delav. 165 (1890). (Yunnan)

Lespedeza caraganae Bunge, Pl. Monghol. Chin. 11.

Lespedeza chekiangensis Ricker in Lignan Sci. Journ. XX, 201 (1942). (Chekiang)

Lespedeza chinensis G. Don, Gen. Syst., II, 307.

Lespedeza ciliata Benth. in Hook. Kew. Journ. IV 48 (1852).

Lespedeza davidi Franch. Pl. Davidian. I, 94 (1884).

Lespedeza delavayi Franch. Pl. Delav. 165 (1890). (Yunnan)

Lespedeza dichromoxylon Leveillé Fl. Kouy Tcheou 236 (1914-1915). (Kweichan)

Lespedeza dielsiana Schindler in Fedde, Repert, X, 404 (1912). (Szechuan)

(1) Noms vernaculaires : Tou Kên (Hart) ; Chan Teou Ken (Soubeiran) [161] ; Shan Tau Ken (P. Smith) [142] ; Szan Dou Gen (Tatarinov).

(2) Noms vernaculaires : Hagi, Ki Hagi, Noha Hagi, Mokaki, Yama Hagi (Japon) [55, 97, 99].

- Lespedeza distincta* L.H. Bailey, Gentes herbarum, 31 (1920).
(Hupeh et Honan)
- Lespedeza diversifolia* Hemsl. in Hook. Ic. Pl. t. 2625.
- Lespedeza dunnii* Schindler in Engl. Jahrb. XLIX, 585 (1913).
(Fokien)
- Lespedeza fasciculiflora* Franch. Pl. Delav. 169 (1890). (Yunnan)
- Lespedeza feddeana* Schindler in Fedde, Repert X, 405 (1912).
(Yunnan)
- Lespedeza floribunda* Bunge, Pl. Monghol. Chin., 13.
- Lespedeza fordii* Schindler in Engl. Jahrb. XLIX, 586 (1913).
(Kwangtung)
- Lespedeza forrestii* Schindler in Fedde, Repert X, 406 (1912).
(Yunnan)
- Lespedeza giraldii* Schindler in Fedde, Repert IX, 510 (1911).
(Shensi et Honan)
- Lespedeza glauca* Schindler in Fedde, Repert IX, 520 (1911).
(Szechuan)
- Lespedeza henryi* Schindler in Fedde, Repert, IX, 517 (1911).
(Yunnan)
- Lespedeza hirtella* Franch. Pl. Delav. 167 (1890). (Yunnan)
- Lespedeza hupehensis* Ricker in Lingnan Sci. Journ. XX, 202
(1942). (Hupeh)
- Lespedeza ichangensis* Schindler in Fedde, Repert IX, 515 (1911).
(Hupeh)
- Lespedeza inschanica* Schindler in Engl. Jahrb. XLIX, 603 (1913).
(Chine du Nord)
- = *Lespedeza juncea* var. *inschanica* Maxim. [id. Mandchourie-
Corée].
- Lespedeza jonocalyx* Nakai Journ. Jap. Bot. XV, 532 (1939).
(Hopei)
- Lespedeza lanceolata* Dunn., in Journ. Linn. Soc. XXXV, 488.
- Lespedeza latifolia* Dunn., in Journ. Linn. Soc. XXXV, 488.
- Lespedeza macrocarpa* Bunge, in Mém. Sav. Etr. Pétersb. II
92 (1835).
- Lespedeza mairei* Pampan. in Nuov. Giorn. Bot. Ital. XVII,
22 (1910).
- Lespedeza medicaginoïdes* Bunge, in Mém. Sav. Etr. Pétersb.
II, 93 (1835).
- Lespedeza merrilli* Ricker in Lingnan Sci. Journ. XX, 202
(1942). (Chekiang)
- Lespedeza metcalfi* Ricker in Amer. Journ. Bot. XXXIII, 258
(1946). (Anhwei)
- Lespedeza monnonyeri* Leveillé Cat. Pl. Yunnan, 158 (1916).
(Yunnan)
- Lespedeza mucronata* Ricker in Amer. Journ. Bot. XXXIII,
257 (1946). (Fokien)
- Lespedeza muehleana* Schindler in Fedde, Repert IX, 517 (1911).
(Hupeh et Szechuan)
- Lespedeza nantcianensis* Pampan in Nuov. Giorn. Bot. Ital.
XVII, 400 (1910).
- Lespedeza pampaninii* Leveillé in Bull. Géog. Bot., XXV, 48
(1915). (Yunnan)

- Lespedeza paradoxa* Ricker in Amer. Journ. Bot. XXXIII, 258 (1946). (Anhui)
- Lespedeza polyantha* Schindler in Fedde, Repert, IX, 520 (1911).
= *Lespedeza eriocarpa* var. *polyantha* Franch.
- Lespedeza rosthorni* Schindler in Fedde, Repert, IX, 516 (1911). (Szechuan)
- Lespedeza schindleri* Lévillé, Cat. Pl. Yunnan, 159 (1916).
= *Lespedeza velutina* - E.P. Bicknell.
- Lespedeza stollssae* L. H. Bailey, Gentes herbarum 32 (1920). (Hupeh et Honan)
- Lespedeza trigonoclada* Franch. Pl. Delav., 167 (1890). (Yunnan),
Lespedeza veitchii Ricker in Lingnan Sci., Journ. XX 203 (1942). (Hupeh)
- Lespedeza velutina* Dunn, in Hook. Ic. Pl. t. 2700 (Feb. 1901).
- Lespedeza viatorum* Champ. ex Benth. in Hook. Kew Journ. IV, 46 (1852).
- Lespedeza wilfordi* Ricker in Lingnan Sci. Journ. XX, 203 (1942). (Hong Kong)
- Lespedeza yunnanensis* Franch. Pl. Delav. 166 (1890). (Yunnan)

Mandchourie

- Lespedeza macrovirgata* Kitagawa in Bot. Mag. Tokyo, XLVIII, 100 (1934). (Hybr. ?)

Sibérie

- Lespedeza maximowiczii* Gandoger in Bull. Soc. Bot. France LX, 460 (1913).
- Lespedeza pallassii* G. Don, Gen. Syst., II, 307.
- Lespedeza trichocarpa* Pers. Syn., II, 318.

Japon

- Lespedeza anthobotrya* Ricker in Amer. Journ. Bot. XXXIII, 257 (1946).
- Lespedeza buergeri* Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 47 (1).
syn. *L. oldhami* Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 48.
- Lespedeza cyrtobotrya* Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 48 (2).
syn. *L. virgata* Sieb. et Zucc. in Abh. Akad. Muench. IV, II 121 (1843).
L. cyclobotrya F.B. Forbes et Hemsl. in Journ. Linn. Soc. Bot. XXIII, 180, 1887.
- Lespedeza homoloba* Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XXXVII, 76, 1923.
- Lespedeza inabensis* Nakai Journ. Jap. Bot. XV, 531, 1939. (Hondo)
- Lespedeza intermixta* Makino in Bot. Mag. Tokyo, XXVII, 249, (1913). (Hybr.).
- Lespedeza kawachiana* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 47 (1927).
- Lespedeza kiusiana* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 26 (1927).

(1) Noms vernaculaires : Ki Hagi, No Hagi.

(2) Noms vernaculaires : Hagi, Maruba Hagi.

- Lespedeza latissima* Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XXXVI, 66 (1922).
- Lespedeza nikkoensis* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 49 (1927).
- Lespedeza nipponica* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 10 (1927).
- Lespedeza patens* Nakai Bot. Mag. Tokyo XXXVII, 79, 1923.
- Lespedeza pilosa* Sieb. et Zucc. in Abh. Akad. Muench., IV, II, 121 (1843) (1).
syn. *L. sylvestris* Matusima. Acta Phytotax. et Geobot. IV, 209 (1925).
- Lespedeza praecox* Nakai in Cat. Sem. Hort., Tokyo 20 (1914); Koidz in Bot. Mag. Tokyo, 1925, XXXIX, 24.
= *L. buergeri*, var. *praecox*, Nakai.
- Lespedeza prostrata* Nakai Bot. Mag. Tokyo, XXXVI, 66 (1922).
- Lespedeza racemosa* Dippel. Handb. Laubholz., III, 720 (1893).
- Lespedeza retusa* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 51 (1927).
- Lespedeza rotundiloba* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 70 (1927).
- Lespedeza satsumensis* Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XLII, 456 (1928).
- Lespedeza sendaica* Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XLIII, 449 (1929).
- Lespedeza serpens* Nakai Lesp. of Japan and Korea, 75 (1927).
- Lespedeza setiloba* Nakai Lesp. of Japan and Korea 68 (1927).
- Lespedeza sieboldi* Miq. Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat. III, 47, id. région Himalaya.
- Lespedeza spicata* Nakai et Maehowa Bot. Mag. Tok. XLVIII, 52 (1934). (Hondo)
- Lespedeza striata* Hook. et Arn. Bot. Beech. Voy. 262 (2).
syn. *L. stipulacea* Maxim. Prim. Fl. Amur. 85.
L. striata var. *stipulacea* Maxim.
- Lespedeza virgata* D.C. Prod. II, 350 (1866) (3).
syn. *L. swinhoei* Hance, in Ann. Sc. Nat. Ser. V, v, 210 (1866).

Formose

- Lespedeza formosensis* Hosokawa in Journ. Soc. Trop. Agric. Taiwan V, 287 (1933).
- Lespedeza pseudomacrocarpa* Hayata Ic. Pl. Formos. III, 71 (1913).
- Lespedeza pubescens* Hayata in Journ. Col. Sc. Tokyo XXX, Art. 1, 80 (1911).
- Lespedeza shimadai* Masamune in Journ. Soc. Trop. Agric. Taiwan II, 30 (1930).

Corée

- Lespedeza bracteolata* Ricker in Lingnan Sci. Journ. XX, 201 (1942) [ou Chine].

(1) Noms vernaculaires : Neto Hagi, Ito Hagi.

(2) Noms vernaculaires : Yahazusô, No Hage, Hime Hage, Iafa dousô Inkusa, No Hagi — Yavadsou sau, K'i yên ts'ao [80].

(3) Noms vernaculaires : Makie Hagi, Hime Koki, Ko Hagi, Fime Ko Hagi.

- Lespedeza densiflora* Uyeki Not. Dendrol. Kor. (1), 3 (1931).
Lespedeza fauriei Lévillé in Fedde, Repert. Nov. Sp., VII, 230 (1909).
Lespedeza friebiana Schindler in Fedde, Repert IX, 514 (1911).
Lespedeza intermedia Nakai in Mori Enum. Pl. Cor. 218 (1922).
 nomen, et in Bot. Mag. Tokyo XXXVII, 76 (1923) descrip.
Lespedeza kiusiana Nakai Lesp. of Japan and Korea, 26 (1927).
Lespedeza latissima Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XXXVI, 66 (1922).
Lespedeza maritima Nakai Bot. Mag. Tokyo, XXXVII, 78 (1923).
Lespedeza maximowiczii C.K. Schneider, 111, Handb. Laubholz. II, 113 (1907).
Lespedeza melanantha Nakai Bot. Mag. Tok., XXXVII, 78 (1923).
Lespedeza racemosa Dippel, Handb. Laubholz. III, 720 (1893).
Lespedeza robusta Nakai Lesp. of Japan and Korea, 72 (1927).
Lespedeza tetraloba Nakai in Tyôsen Sanrin Kaihō (japonice) n° 122, 25, 32 (1935) et in Journ. Jap. Bot. XV, 680 (1939) (latine).
Lespedeza vekii Nakai in Bot. Mag. Tokyo, XLII, 457 (1928).

Java

- Lespedeza cytisoides* Benth. in Miq. Pl. Jungh., 230.
Lespedeza virgata Miq. Fl. Ind. Bat., I, I, 230.

Birmanie

- Lespedeza decora* Kurz in Journ. As. Soc. Beng., XLII, II, 231 (1873).
Lespedeza parviflora Kurz in Journ. As. Soc. Beng. XLII, II, 231 (1873).
Lespedeza pinetorum Kurz in Journ. As. Soc. Beng. XLII, II, 230 (1873).
Lespedeza prainii Collett et Hemsl. in Journ. Linn. Soc., XXVIII, 46 (1890).
Lespedeza sericophylla Collett et Hemsl. in Journ. Linn. Soc. XXVII, 45 (1890).
Lespedeza sessilifolia Gamble in Kew Bull., 199 (1912).

Australie

- Lespedeza lanata* Benth., Fl. Austral. II, 241.

On compte aussi des espèces horticoles ou cultivées :

- Lespedeza grandis* Koïdz in Acta Phytotax. et Geobot., IV, 159 (1935). (Hort.)
Lespedeza hiratukae Nakai in Journ. Jap. Bot. XIV, 637 (1938). (Cult.)

En outre certains auteurs ont rangé dans les *Lespedeza* des espèces qui sont maintenant rattachées à d'autres genres : *Campylotropis*, *Desmodium*, *Flemingia*, *Heylandra*, *Indigofera*, *Rhynchosia*, *Trifolium*, *Uraria*.

CHAPITRE II

L'ESPÈCE *LESPEDEZA CAPITATA* Michx.

C'est A. MICHAUX, qui créant le genre *Lespedeza* en 1803 dans la Flore boréale américaine, a décrit l'espèce *Lespedeza capitata* à côté de trois autres espèces.

Synonymes de l'espèce :

Lespedeza frutescens Ell. (Sketch. II, 206) (1824).

Lespedeza fruticosa Pers. (Syn. II, 318) (1807).

Lespedeza longifolia D.C. (Prod. II, 349) (1825).

Hedysarum frutescens Willd. (Sp. Pl. 3, 1193) (1803).

Noms vernaculaires en Amérique du Nord :

Dusty-Clover, round-headed bush Clover, shrubby Lespedeza.

Voici la diagnose de MICHAUX :

Leg. erecta : foliis subsessilibus, foliolis oblongis, capitulis sessiliter conglomerato terminalibus, legumine intra calycem, multo majorem recondito. Hab. in Virginia et Carolina.

AIRE GÉOGRAPHIQUE :

Le *Lespedeza capitata* pousse spontanément dans toute la partie Est des Etats-Unis d'Amérique ; son aire de répartition est délimitée sensiblement : au Nord par la frontière du Canada ; au Sud par le Golfe du Mexique ; à l'Est par l'Océan Atlantique ; à l'Ouest par une ligne coupant les Etats du Minnesota, Sud Dakota, Nebraska, Kansas, Oklahoma et Texas. Il peut donc exister à l'état sauvage et en stations plus ou moins abondantes dans près de la moitié des Etats-Unis d'Amérique.

Les différentes variétés du *Lespedeza capitata*, ont comme nous le verrons plus loin des aires géographiques plus limitées.

ETUDE MORPHOLOGIQUE DU *Lespedeza capitata* MICHX. (fig. 1).

En dehors de la diagnose de MICHAUX, une description morphologique du *Lespedeza capitata* figure dans un certain nombre de Flores [18, 25, 31, 51, 118, 123, 178].

L'ouvrage le plus récent donnant une bonne description de l'espèce est le Manuel of Botany de M. L. FERNALD [51], nous le suivrons ici, en le complétant parfois par nos observations personnelles et celles d'autres auteurs, nous signalerons en particulier les principales différences avec l'espèce voisine *L. hirta* qui se trouve parfois mêlée aux échantillons reçus comme *L. capitata*.

Le *Lespedeza capitata* Michx. croît sur des terrains secs, sablonneux en général, dans les champs, à la lisière des bois. C'est une



Fig. 1. *Lespedeza capitata* Michaux. Rameaux fleuris. Herbar du Museum de Paris. (Réduction aux 2/5).

plante vivace, à racines très ramifiées, herbacée, dont la hauteur varie de 0,60 à 1,20 m. La tige, (fig. 2) cylindrique assez rigide.



Fig. 2. — Tige feuillée de *Lespedeza capitata*. Echantillon récolté en France. (Réduction aux 2/5).

dont le diamètre est compris entre 2 et 5 mm, est entièrement herbacée à l'état jeune, mais devient plus ou moins ligneuse dans le quart inférieur à maturité. Cette tige se ramifie un peu vers le haut.

Les racines jaunâtres, sont excessivement ramifiées. On distingue de grosses racines latérales de 5 à 7 mm de diamètre, croissant dans toutes les directions, et donnant naissance à de très nombreuses radicelles qui rayonnent jusqu'à 0,90 m de chaque



Fig. 3. — Feuilles de *Lespedeza capitata*. (Grossissement $\times 1,5$).

côté du pied. Elles s'enfoncent profondément dans le sol (jusqu'à 2 m et plus), ce qui en définitive crée pour chaque pied une aire d'absorption très importante [186].

Les feuilles, trifoliolées (fig. 3), presque sessiles ou portées par un court pétiole (plus long chez *L. hirta*) - brun-rouge, de 5 mm environ, ont deux stipules bien subulés à la base.

Les folioles sont entières, de consistance ferme, très polymorphes, elliptiques à linéaires, leur longueur varie de 2,5 à 4 cm.



Fig. 4. — Inflorescence de *Lespedeza capitata*. Echantillon récolté en France.
(Réduction aux 2/5).



Fig. 5. — Jeune pied de *Lespedeza capitata* cultivé en France. (Réduction au $\frac{1}{4}$).

sans le pétiole et leur largeur entre 0,60 et 1,10 cm. Certains échantillons provenant de la plante cultivée en France à partir de graines américaines ont des folioles plus grandes ($L = 5$ cm, $l =$ jusqu'à 2 cm). Elles sont obtuses ou aiguës, les folioles jeunes sont habituellement soyeuses et pubescentes sur les deux faces mais à maturité elles le sont seulement sur la face inférieure. La différenciation des variétés repose comme nous le verrons sur ces caractères.

Les inflorescences (fig. 4) forment des « têtes » presque sphériques très compactes, les fleurs sont presque sessiles ou portées sur des pédoncules beaucoup plus courts que les feuilles, ce dernier caractère différencie nettement le *Lespedeza capitata* du *Lespedeza hirta* chez lequel le pédoncule floral est beaucoup plus long que les feuilles.

Le calice a de 7 à 13 mm de long.

La corolle, blanc crème, a 6 mm de long, l'étendard porte un point violacé. De nombreux auteurs comme BRITTON et BROWN [25] ont cru que les fleurs du *Lespedeza capitata* étaient toutes complètes, cependant TORREY et GRAYS avaient remarqué, dès 1840, l'importance des fleurs apétales pour la classification des *Lespedeza* [179].

Chez le *Lespedeza capitata* on trouve de petites fleurs cléistogames et apétales parmi les autres.

Aux Etats-Unis, la floraison a lieu fin août, début septembre suivant les années.

En France, des cultures furent entreprises, dans le Val de Loire à partir de graines provenant d'Amérique du Nord. Les graines semées en pleine terre en mai germent en une quinzaine de jours et les plantes sont repiquées en pleine terre l'hiver suivant, la plante de première année fleurit en août et atteint 1,25 m à 1,50 m. Elle fructifie en septembre. On peut faire deux récoltes par an, en fauchant l'une en juin (plante en début de floraison ; hauteur : 50 à 60 cm), l'autre en septembre (tige feuillée, hauteur : 40 à 50 cm (fig. 5).

La plante étant vivace, le pied reste en terre et de nouvelles pousses apparaissent vers le mois d'avril.

VARIÉTÉS DE L'ESPÈCE *Lespedeza capitata* MICHX.

Le *Lespedeza capitata* est une espèce des plus variables qui, en Amérique du Nord, se croise avec plusieurs espèces parmi lesquelles : *Lespedeza reticulata* Pers., *Lespedeza intermedia* Nak., *Lespedeza polystachya* Michx., *Lespedeza angustifolia* Ell.

Plusieurs variétés sont distinguées chez le *Lespedeza capitata* par M. L. FERNALD [51], selon la forme des folioles, leur pubes-

cence plus ou moins dense et brillante, et l'aspect des inflorescences. Selon l'auteur, le *Lespedeza capitata* type (= var. *sericea* H. et A.) a des feuilles oblongues, elliptiques, argentées sur la face inférieure, des inflorescences très denses et courtement pédonculées et une aire de répartition étendue dans tout l'Est des Etats-Unis, du Massachussets à la Floride.

Il décrit, en outre, quatre variétés :

— var. *vulgaris* T. et G., la plus septentrionale, à feuilles presque ternes.

— var. *calycina* Schindl. à calice de grande dimension, méridionale (Virginie, Texas de l'Est et Floride).

— var. *stenophylla* Bissel et Fern., à feuilles étroites, soyeuses sur la face inférieure.

— var. *velutina* Bickn. Fern. (= *Lespedeza Bicknellii* House), dont les folioles ont une pubescence dense, cendrée. Elle est localisée dans le Nord Est.

CHAPITRE III

TRAVAUX PERSONNELS

ÉTUDE ANATOMIQUE DU *LESPEDAZA CAPITATA* Michx.

Certains caractères anatomiques des *Lespedeza* ont été signalés par METCALFE [101] qui insiste particulièrement sur les cellules tannifères que l'on retrouve dans les différents organes.

Racine

Des coupes transversales ont été pratiquées sur des échantillons moyens de 2 mm de diamètre (fig. 6).

En coupe, de l'extérieur vers l'intérieur, on rencontre un suber mince formé de 2 ou 3 assises de cellules allongées tangentiellement ; le parenchyme cortical présente un aspect plus ou moins tourmenté ; les cellules, à paroi cellulosique, sont de formes et de dimensions différentes et il existe des amas irréguliers formés d'un petit nombre de fibres lignifiées. Celles-ci sont également présentes dans la région péricyclique et la zone externe du liber.

Le bois, parcouru par des rayons ligneux bi ou tri-sériés, possède un parenchyme ligneux entièrement lignifié. Dans quelques vaisseaux on peut remarquer un contenu cellulosique, coloré en rouge à la double coloration, obstruant partiellement leur lumière (thylles ?).

Tige

Des coupes transversales ont été pratiquées sur des tiges de 2 mm de diamètre, de section subcirculaire. Elles présentent une structure typique de Dicotylédones (fig. 7).

L'épiderme porte de nombreux poils tecteurs formés d'une petite cellule de base et d'une cellule terminale allongée. Leur longueur varie de 0,5 à 1 mm.

Le parenchyme cortical, de très faible épaisseur, est légèrement collenchymateux.

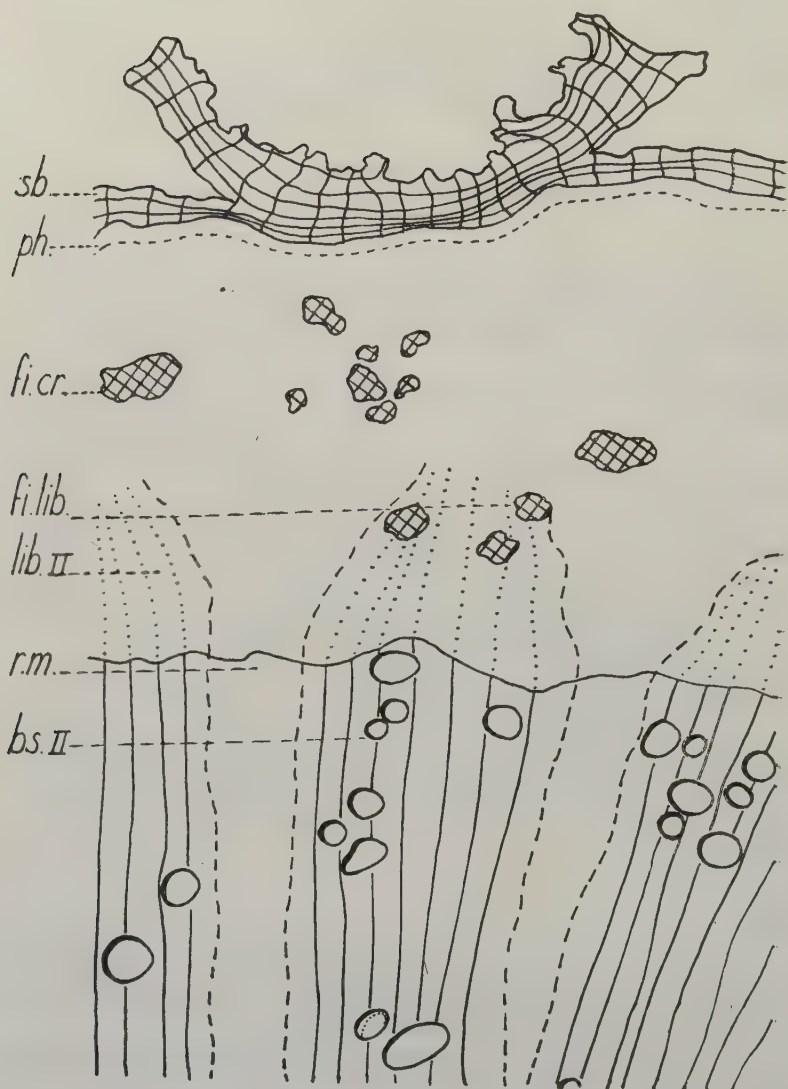


Fig. 6. — Racine de *Lespedeza capitata* Michx. — Coupe transversale (schéma) : sb. suber ; ph., phelloderme ; fi. cr., fibres cristalligènes ; li. II, liber secondaire ; rm, rayon médullaire ; bs II bois secondaire.

Le système libéro-ligneux est continu, entouré d'amas réniformes de fibres péri-cycliques.

On doit noter la grande dimension des tubes criblés libériens ; la moelle est assez développée et formée de cellules polyédriques.

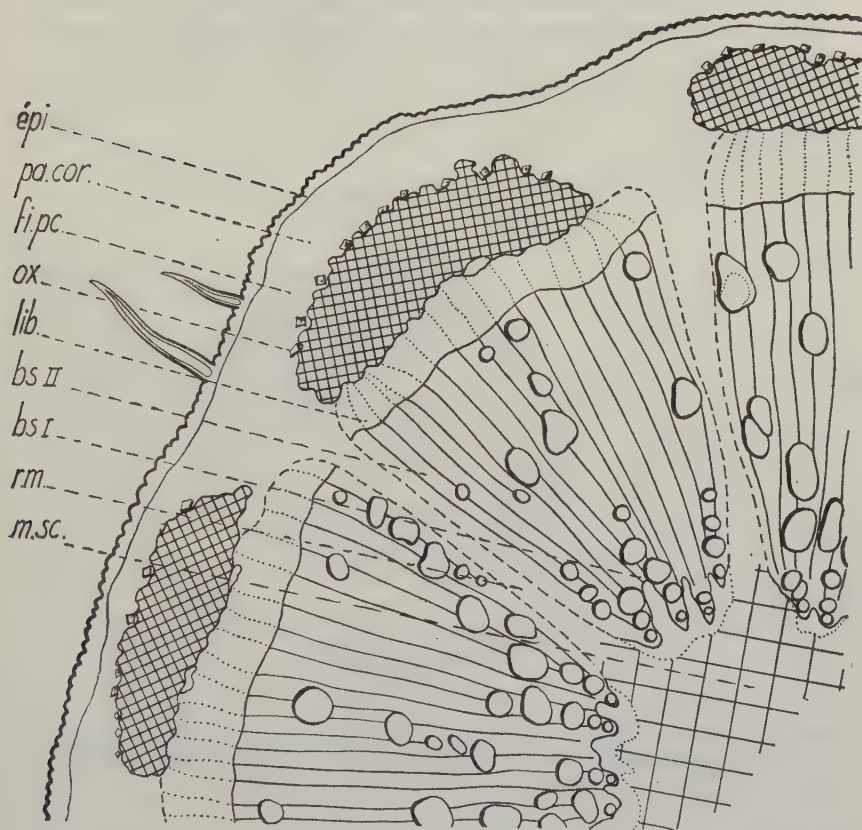


Fig. 7. — Tige de *Lespedeza capitata* Michx. — Coupe transversale (schéma) : épi, épiderme ; pa. cor., parenchyme cortical ; fi. pé., fibres péri-cycliques ; ox., oxalate de calcium ; lib., liber ; bs I, bois primaire ; bs II, bois secondaire ; rm, rayon médullaire ; m. sc., moelle sclérifiée.

Feuille

Des coupes transversales ont été effectuées au niveau de la nervure médiane assez saillante (fig. 8).

On remarque un seul arc libéro-ligneux entouré de fibres péricycliques.

Le limbe comporte deux assises de tissu palissadique surmontant un tissu peu lacuneux.

Les poils tecteurs sont nombreux, surtout au niveau de la nervure et sur la face inférieure. Ils comportent une petite cellule basale et une grande cellule terminale allongée et pointue à l'extrémité.

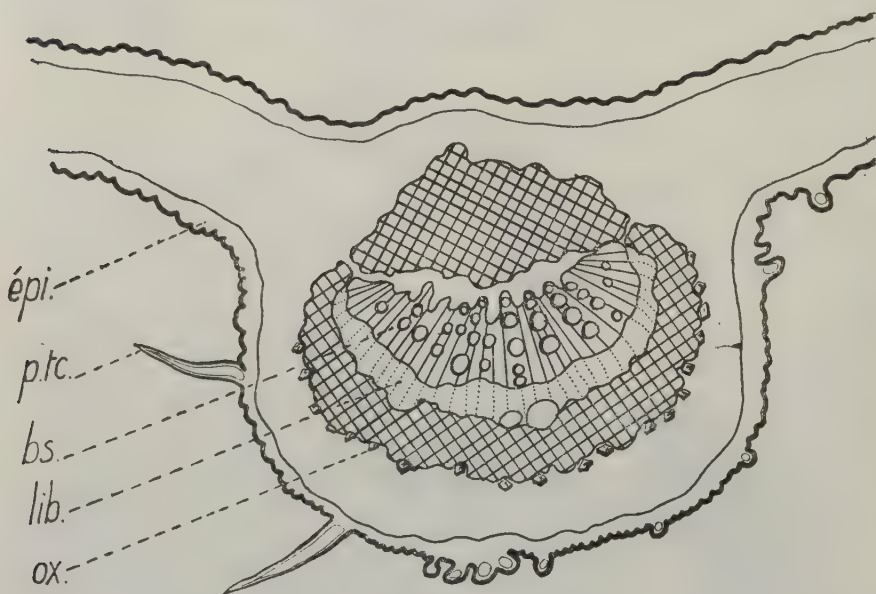


Fig. 8. — Foliole de *Lespedeza capitata* Michx. — Coupe transversale (schéma). — épi., épiderme ; p. t., poil tecteur ; bs, bois ; lib., liber ; ox., oxalate de calcium.

Dissociation des éléments histologiques du bois de la racine

Nous avons employé la méthode de G. L. FRANKLIN [57] : un morceau de 1 cm de long est fendu en éclats d'environ 2×2 mm qui sont mis à bouillir dans l'eau, jusqu'à saturation, le morceau imbibé tombe alors au fond.

On laisse refroidir et dans un tube à bouchon vissé, on immerge dans un mélange à partie égale (environ 15 ml) d'acide acétique cristallisable et d'eau oxygénée à 20 volumes. On bouche hermétiquement et on porte à l'étuve à 60° .

Après 48 heures, les morceaux de bois sont prélevés et plongés dans un tube contenant de l'eau distillée. Par simple agitation on obtient une grande quantité de fibres dissociées. On monte directement entre lame et lamelle. Les fibres du *Lespedeza capitata* sont minces, effilées aux deux bouts, à lumen très étroit ; leur longueur est comprise entre 0,40 et 1,2 mm, la majorité mesurant 0,75 mm ; leur largeur est généralement comprise entre 0,010 et 0,015 mm.

Les vaisseaux conducteurs sont en majorité ponctués, de 0,035 à 0,045 mm de diamètre. On remarque aussi quelques fibres plus courtes (0,25 mm) à paroi canaliculée.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE CHIMIQUE

CHAPITRE PREMIER

TRAVAUX CHIMIQUES ANTERIEURS

Parmi les espèces de *Lespedeza* décrites jusqu'à ce jour et répertoriées dans l'*Index Kewensis*, un petit nombre seulement a fait l'objet d'investigations chimiques.

La plupart des travaux sont en relation avec la valeur alimentaire de ces végétaux, employés largement comme fourrage aux Etats-Unis.

Ainsi le *Lespedeza striata* Hook. et Arn., a été très étudié.

WATT [185] fait mention de sa teneur en cendres : 5,92% (4,35% d'après WEHMER [187], citant COLLIER [36] qui donne les chiffres suivants : CaO 29,6% ; K₂O 40,4% ; SiO₂ ; 6,61% Cl 4,23%). D'après WATT, les cendres seraient riches en phosphates et sulfates acides de calcium, magnésium et potassium. Plus récemment PIEPERS, SEARS et BAUER [135], reprenant l'étude de certaines variétés, trouvent de 5,8 à 7,4% de cendres.

Ces derniers auteurs ont également déterminé, pour le *Lespedeza striata* et deux de ses variétés américaines de culture « Tennessee » et « Kobe », la teneur en protéines qui est de 12 à 16% du poids sec.

En 1951, KUROSAKI et YUYAMA [87] trouvent dans les *Lespedeza bicolor* Turcz., *Lespedeza japonica* Bailey et *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. jusqu'à 20% de protéines, ce qui explique que cette dernière espèce soit de plus en plus utilisée comme fourrage.

En ce qui concerne les lipides du *Lespedeza striata* Hook. et Arn., alors que la plante entière n'en contient que 1% environ [185], les graines en sont particulièrement riches, environ 11% [191] ce qui, étant donné par ailleurs leur teneur élevée en protides, les fait largement utiliser comme aliment d'appoint dans les rations du bétail.

Plusieurs auteurs, cités par ECKEY [46], ont étudié les matières grasses des graines de *Lespedeza striata* Hook. et Arn. : WILEY-CAGLE [191, 192, 194], MORRISON [108]. Ces auteurs, par les solvants habituels, extraient une huile jaune-verdâtre, assez semblable à l'huile de Lin, d'indice d'iode 147,2, d'indice de saponification 189,3 et renfermant 5,6% d'insaponifiable.

Poursuivant leur étude, WILEY et CAGLE [193] trouvent pour l'huile de *Lespedeza striata* un spectre d'absorption en lumière ultra-violette similaire de celui obtenu avec l'huile des graines de Lin.

La teneur en vitamines a également été recherchée pour certaines espèces. Au Japon, dans le *Lespedeza bicolor* Turcz., var. *japonica* Nak., SUMIDA et MORIMOTO [169] ont trouvé 149,7 U.I. au gramme de vitamine A, cette espèce serait donc plus riche que la Luzerne qui ne renferme que 107,7 U.I. au gramme.

Aux Etats-Unis, Mac LEOD [96], dose 200 U.I. au gramme dans le *Lespedeza sericea* Benth. frais, ce pourcentage tombant à 100 et même 50 U.I. au gramme pour la plante sèche.

Dans la même espèce, Mac LEOD trouve 5 U.I. au gramme de Vitamine B₁.

PATRICK et MORGAN [131] plus récemment utilisent la méthode fluorométrique pour doser la riboflavine qu'ils extraient du *Lespedeza stipulacea* Maxim. (= *Lespedeza striata* Hook. et Arn.), espèce très proche de *Lespedeza sericea* Miq. et concluent à son utilisation possible comme source de vitamine B₂ pour la volaille.

Mais c'est surtout une espèce japonaise, le *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. qui a fait l'objet de travaux approfondis en ce qui concerne ses dérivés flavoniques.

Etant donné l'importance de ces substances chez le *L. cyrtobotrya* Miq. et chez le *L. capitata* Michx. qui fait l'objet de nos travaux personnels, nous avons cru bon de rappeler tout d'abord la constitution chimique de ces pigments jaunes, très répandus chez les végétaux et d'ailleurs particulièrement abondants chez les Légumineuses.

Il s'agit de substances hétérocycliques dérivant de la phénylbenzo- γ -pyrone (fig. 10, I) ou phénylchromone, la phényl-2-benzopyrone étant la flavone proprement dite.

Elles s'apparentent aux coumarines (benzo- α -pyrone) (fig. 9) aux catéchols et pigments anthocyaniques, dérivés du chromanne.

Les flavonoïdes encore dénommés anthoxanthines (jaune foncé en milieu alcalin, jaune pâle ou incolores en milieu acide), possèdent généralement sur les deux noyaux aromatiques (A et B) plusieurs hydroxyles phénoliques (sur le cycle A : en 5, 6, 7, ou 8, souvent en position méta et sur le cycle B en 4' et plus rarement en 2', 3', 5' ou 6'). Ceux-ci sont généralement libres mais peuvent

être méthylés (un ou plusieurs OCH_3), d'autres substitutions (méthylène dioxy, etc...) sont exceptionnelles.

Ces flavonoides polyphénoliques libres (ou génines flavoniques) sont souvent combinés à un ou plusieurs sucres (flavonosides).

Suivant la structure du noyau on subdivise les dérivés flavoniques en plusieurs catégories.

a) Flavones proprement dites (fig. 10, I) à noyau phényl-2-benzo-pyrone comportant souvent un ou plusieurs hydroxyles phénoliques.

b) Flavonols (fig. 10, II), très voisins mais ayant un hydroxyle alcoolique en position 3 sur le cycle pyronique.

c) Flavanones (fig. 10, III) formes réduites ne possédant pas

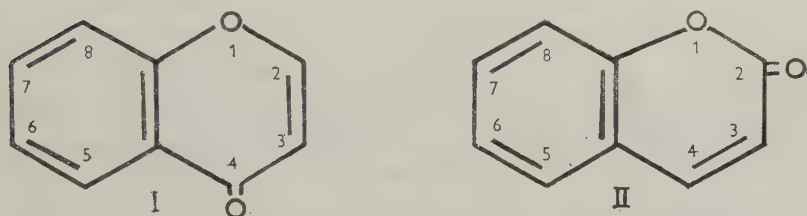


Fig. 9. — I. Chromone (Benzo γ pyrone). — II. Coumarine (Benzo α pyrone).

de double liaison en 2-3 sur l'hétérocycle, flavanonols (avec un OH en 3) correspondant aux flavonols.

d) Chalcones (fig. 10, V) isomères des flavanones avec ouverture du noyau pyronique.

e) Isoflavones (fig. 10, IV) dérivant de la phényl-3-benzo-pyrone (ou phényl-3-chromone).

On peut rattacher aussi aux flavonoïdes les xanthones (fig. 10, VI) (à noyau dibenzopyrone) et les aurones (fig. 10, VII), pigments anthochlores à noyau benzalcoumaranone.

En 1924, T. ASAI, isole de *Lespedeza cyrtobotrya* un glucoside du kaempférol, qui fut alors identifié par TASAKI à la kaempféritrine [174] de formule $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$, isolée dès 1907 par PERKIN [132] des feuilles de l'*Indigofera arrecta*, Légumineuse de Java.

La kaempféritrine (P.F. 203°) est hydrolysable par les acides en deux molécules de rhamnose et une molécule de kaempférol qui est le 5-7-4' trihydroxy-flavonol.

D'autre part, en 1933, OHIRA [119] isole 0,68% d'ériodictyol à partir des feuilles du *Lespedeza cyrtobotrya* ; l'ériodictyol appartient au groupe des flavanones, c'est la 5-7-3'-4' tétrahydroxy flavanone, forme flavanonique correspondant à la lutéoline.

Enfin en 1939, HATTORI et HASEGAWA [71] ont repris l'étude de ces dérivés, et en particulier celle du glucoside isolé par ASAI dont ils recommencent l'extraction, par le procédé décrit par cet auteur. Les feuilles fraîches du *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. récoltées

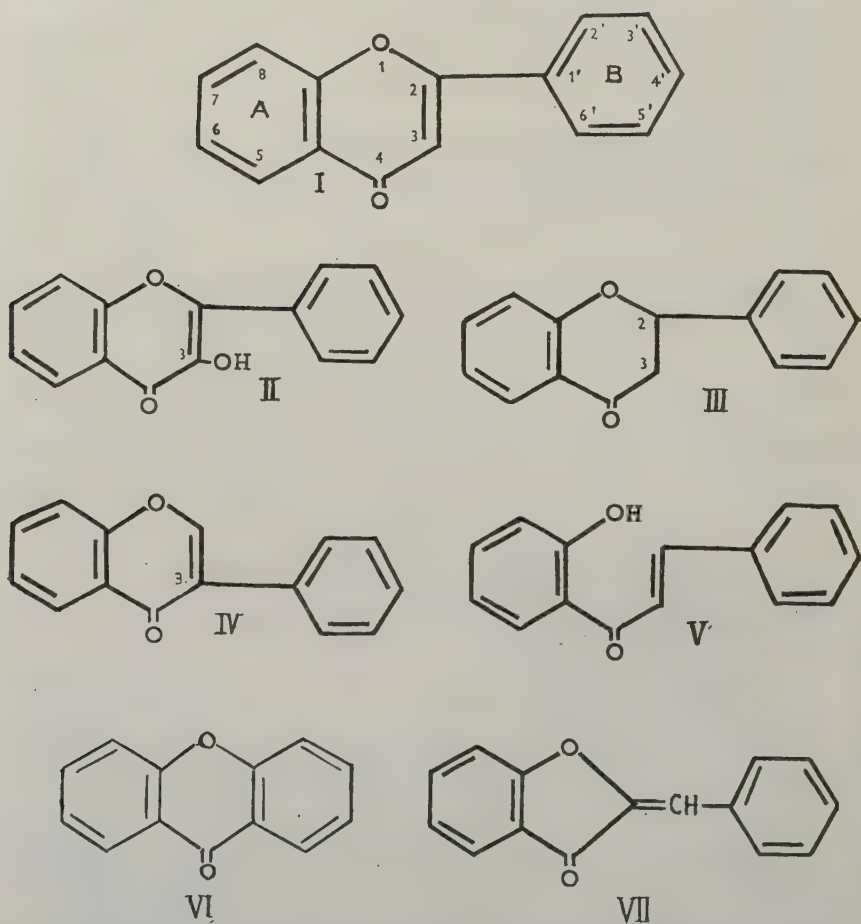


Fig. 10. — Différents types de flavonoïdes. I. Flavone ; II. Flavonol ; III. Flavanone ; IV. Isoflavone ; V. Chalcone (Hydroxychalcone) ; VI. Xanthone ; VII. Aurone.

au mois d'août, sont traitées à l'ébullition pendant trois heures avec 5 parties d'alcool à 40°. Dans le filtrat chaud, l'addition d'acétate neutre de plomb provoque la formation d'un précipité

qui est éliminé. Le filtrat est concentré sous pression réduite. Après élimination du plomb par l'hydrogène sulfuré, il se forme dans la liqueur en quelques jours de petites aiguilles de glucoside qui sont ensuite recristallisées dans l'alcool à 90°. Le rendement final est de 0,1%.

La substance obtenue présente de grandes analogies avec la kaempféritrine mais possède un point de fusion de 30° plus élevé ; cet écart conduisit HASEGAWA à penser qu'il s'agissait d'un corps différent, qu'il nomma « Lespédine » [69].

Les recherches ultérieures montrèrent qu'il s'agissait en fait d'un bi-rhamnoside du kaempférol : le kaempférol 3-7-birhamnoside, de formule brute $C_{27}H_{30}O_{14}$.

La lespedine est obtenue dans l'alcool à 90° en petites lamelles, de point de fusion : 234°, cristallisant avec 3,5 molécules d'eau.

Par cristallisation dans l'eau, on obtient une nouvelle forme de point de fusion 193°, cette transformation est réversible par recristallisation dans l'alcool.

La dessiccation de la première forme sous vide à 115°, en présence d'anhydride phosphorique ne modifie pas le point de fusion ce qui permet à l'auteur de conclure à un dimorphisme analogue à celui observé par SANDO en 1932 pour la robinine [154] du *Robinia pseudoacacia* L.

HASEGAWA précise par ailleurs les propriétés de la lespédine. Cette substance est légèrement soluble dans l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle, mais difficilement soluble dans le benzène et l'eau froide ; sa solution alcoolique se colore en brun foncé par addition de chlorure ferrique.

L'hydrolyse peut être effectuée par chauffage avec 160 parties d'acide sulfurique à 2% pendant 30 minutes dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux ; l'aglycone jaune obtenu est filtré après refroidissement, lavé à l'eau, séché et pesé (rendement 47,9%). Calculé pour la formule $C_{27}H_{30}O_{14}$: kaempférol 48,45%.

L'aglycone se présente après deux recristallisations dans l'alcool à 90° sous forme d'aiguilles jaunes fondant à 273°, le mélange avec une préparation authentique de kaempférol n'entraînant aucun abaissement du point de fusion.

Dans les eaux mères d'hydrolyse neutralisées par le carbonate de baryum, après filtration, le rhamnose a pu être caractérisé à l'état de rhamnose-phénylosazone (P.F. 183°), soluble dans l'acétone.

Les auteurs ont préparé également un acétylkaempférol par chauffage de 0,20 g de kaempférol avec 10 parties d'anhydride acétique et une goutte de pyridine, au bain-marie pendant une heure et demie. Après refroidissement le mélange est versé dans l'eau froide et fortement agité ce qui provoque la cristallisation.

Après recristallisation dans le méthanol, on obtient un dérivé acétylé qui commence à fondre à 112-120° puis se resolidifie pour fondre définitivement vers 185°, propriétés caractéristiques, déjà constatées pour le kaempférol provenant de la robinine.

Le point de fixation des sucres sur la molécule a été déterminé par l'analyse spectrophotométrique en solution alcoolique. Le premier maximum d'absorption de la lespédine se situe à 300 m μ alors que celui du kaempférol est à 265 m μ , HASEGAWA put donc conclure avec HATTORI que la lespédine porte au moins une molécule de rhamnose en position 3 du kaempférol. Enfin, c'est d'après les résultats de méthylations successives puis d'hydrolyse et les données spectrophotométriques que les auteurs parvinrent à démontrer que l'autre molécule de rhamnose n'était pas fixée en 3 sous forme de birhamnose mais bien en position 7. La lespédine est donc le kaempférol-3-7-birhamnoside.

En 1951, HATTORI [70] ayant appris que BATESMITH [14] utilisait pour ses études chromatographiques un témoin de kaempféritrine provenant de la collection de PERKIN, lui envoya un échantillon de lespédine pour la détermination des points de fusion du mélange des deux glucosides et des données chromatographiques.

Les résultats furent les suivants :

	Point de fusion	P. F. crist.
Kaempféritrine	190-192°	194°
Mélange	190-194°	195°
Lespédine	190-194°	195°

Rf = 0,71 (mélange de Partridge : Butanol acétique) pour les deux substances.

L'identité de la lespédine et de la kaempféritrine se trouve ainsi établie, et le nom de lespédine doit être abandonné.

Signalons que plusieurs auteurs ont retrouvé ces dernières années l'hétéroside du *Lespedeza cyrtobotrya* (kaempférol-3-7-birhamnoside) dans des végétaux appartenant à différentes familles qui sont :

LÉGumineuses.

- *Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel : NAKAOKI, MORITA, HIRAKI et KUROKAWA [114];
- *Dorycnium rectum* Ser. : PARIS, STAMBOULI [129].

CÉLastracées.

- *Celastrus orbiculatus* Lamk. : KANAO, SHIMOKORIYAMA [85].

COMPOSÉES.

- *Tagetes erecta* L. : MORITA [105].

CUCURBITACÉES.

- *Trichosanthes cucumeroïdes* Max. et *Trichosanthes japonica* R. : NAKAOKI, MORITA [113].

TILIACÉES.

— *Tilia argentea* Desf. : HÖRHAMMER, STICH et WAGNER [81].

D'autre part, en 1956, à partir des feuilles d'une autre espèce de *Lespedeza*, le *Microlespedeza striata* (= *Lespedeza striata* Hook. et Arn.) NAKAOKI et ses collaborateurs [114] isolèrent un principe flavonique reconnu comme étant la lutéoline-7-glucoside ($C_{21}H_{20}O_{11}$) avec un rendement de 0,15%.

La lutéoline (5-7-3'-4' tétrahydroxyflavone) a été isolée notamment de *Reseda luteola* L., *Galega officinalis* L., *Humulus japonicus* Sieb. et Zucc.

Parmi les autres constituants polyphénoliques étudiés dans les *Lespedeza* il faut signaler la présence de pigments anthocyaniques. En 1945, HAYASCHI, NOGUCHI et ABE [72] ont isolé la malvidine 3-5-diglucoside ($C_{29}H_{30}O_{17}$, 8 OH₂) des pétales du *Lespedeza thunbergii* Nakai.

Les tanins étudiés chez certaines espèces de *Lespedeza* sont en quantité très variable suivant l'époque de la végétation. Ainsi pour le *Lespedeza sericea* Benth. la proportion de tanins totaux d'après CLARKE, FREY et HYLAND [33] passe de 7,5% au début du printemps à 18% en juillet quand la plante commence à sécher.

Des constatations analogues sont faites par STITT et CLARKE [166].

La nature du sol [168], l'intensité de l'éclairement [166] etc... influent également sur le pourcentage de ces constituants. LEASE et MITCHELL [90] trouvent plus d'acide tannique dans les feuilles que dans les tiges.

Signalons enfin une intéressante relation établie par STITT et HYLAND [167] entre les tanins et les protéines brutes des feuilles du *Lespedeza sericea* Benth. : la teneur en tanin est basse quand celle en protéines est élevée, ces auteurs donnent même un coefficient établissant sur 71 échantillons, la corrélation entre ces deux groupes de substances.

La teneur en tanins varie de 1,5 à 17,8% et celle en protéines de 9,9 à 32,8%.

Enfin en 1958, la présence d'alcaloïdes à propriétés ocyto- ciques a été signalée dans les feuilles sèches du *Lespedeza bicolor* Turcz. var. *japonica* Nak. par GORO et ses collaborateurs [61].

A partir d'un extrait méthanolique repris par l'acide chlorhydrique dilué, les auteurs après alcalinisation par l'ammoniaque et épuisement par l'acétate d'éthyle, obtiennent 250 mg/kg d'une substance en $C_{12}H_{16}N_2$, fondant à 48-49°, qu'ils nomment alcaloïde L et qui serait le N-N-diméthyltryptamine. Cette substance a une action contracturante sur l'utérus de Hamster à la dilution de $1-2 \times 10^{-6}$.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Les essais préliminaires effectués en 1957 sur le *Lespedeza capitata* Michx, ont porté sur la drogue sèche, récoltée aux Etats-Unis près de Boston en septembre 1950, et constituée par la plante fleurie ou fructifiée, sans les racines.

Humidité

Le dosage de l'humidité a été fait sur 2 g de drogue, pulvérisée et pesée dans un cristalliseur taré. On porte successivement à l'étuve à 37° pendant 24 heures, à 60° pendant 24 heures et à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant.

La teneur en eau est de 8,80%.

Cendres

La drogue préalablement séchée à 100° est incinérée puis calcinée d'abord avec précaution dans une capsule en quartz de 7 cm de diamètre et de 1 cm de hauteur jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucune partie charbonneuse et à poids constant.

Le résidu, pesé après refroidissement, correspond à une teneur en cendres totales de 4,35%.

Indice de mousse

Le décocté de la drogue sèche mousse faiblement. L'indice de mousse est déterminé à partir d'un digesté à 1%.

Dans une série de tubes à essais de 16 cm de long et de 16 mm de diamètre on introduit des quantités croissantes (1, 2, 3..., 10 ml) de digesté et l'on complète à 10 ml avec de l'eau distillée, on bouche et on agite les tubes pendant 15 secondes : la dilution du tube où la mousse atteint une hauteur de 1 cm et persiste au moins quinze minutes donne l'indice :

La mousse atteint 1 cm, mais ne persiste que 8 minutes dans le tube n° 10 (concentration 1%) - l'indice est donc inférieur à 100.

Recherche et dosage des tanins.

Quand on ajoute à un infusé à 5% quelques gouttes de solution diluée de chlorure ferrique, on voit se développer une coloration vert noirâtre.

Si on additionne le même infusé de quelques gouttes d'acide

chlorhydrique et que l'on porte à l'ébullition il se forme un précipité rouge abondant (rouge catéchique ou phlobaphène). Le sous-acétate de plomb donne un important précipité jaunâtre.

D'autre part 50 ml d'infusé à 5% sont additionnés de 10 ml de formol à 40% puis de 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (réactif de Stiasny). On chauffe le tout pendant 30 minutes à une température inférieure à l'ébullition et l'on obtient un abondant précipité rouge de tanins catéchiques. Après repos et filtration le liquide clair est additionné d'un excès d'acétate de sodium puis de quelques gouttes d'alun de fer à 1% : il apparaît alors une légère coloration verdâtre et non bleu noir ce qui indiquerait la présence de tanins galliques.

Le dosage des tanins catéchiques a été effectué à l'aide du réactif de Stiasny.

2 grammes de parties aériennes (tiges+feuilles) sont pulvérisés et mis à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, puis laissés en contact pendant 2 heures avec 180 ml d'eau à 80°. On filtre, on lave le résidu à l'eau chaude jusqu'à obtention d'un volume final de 200 ml.

100 ml de ce filtrat sont précipités par addition de 50 ml de réactif de Stiasny. Après repos de 24 heures le précipité est recueilli sur un filtre taré, lavé jusqu'à neutralité et desséché à 100° à poids constant.

La proportion de tanins catéchiques et de catéchines trouvée est de 8,70% de la drogue sèche.

La deuxième partie du filtrat (100 ml) est additionnée de 50 ml de solution de gélatine salée (solution à 1% de gélatine soluble, saturée de chlorure de sodium et filtrée à chaud). Ce réactif précipite les tanins catéchiques mais non les catéchines ; après acidification, décantation et filtration, on ajoute au nouveau filtrat 50 ml de réactif de Stiasny ; on termine comme précédemment, on trouve 3,90% de catéchines.

Etant donné qu'il s'agissait d'un échantillon déjà ancien, une autre détermination a été effectuée sur la plante récoltée en France en 1959 : elle a été effectuée par la méthode officielle (Assoc. Franç. Chimistes Ind. Cuir) modifiée qui détermine le pourcentage de tanins adsorbés par la poudre de peau.

On utilise un vase cylindrique de forme haute, de capacité suffisante ; ce vase est chauffé au bain-marie. On emploie d'autre part un tube à entonnoir courbé deux fois à angle droit et dont la cloche a été fermée par un morceau de mousseline bien lavée ; ce tube est introduit, cloche en bas, dans le bécher où elle est recouverte d'une couche de sable pur de 2 cm d'épaisseur ; l'autre extrémité du tube est reliée à une fiole à vide, elle-même reliée à une trompe ; la drogue à épuiser est placée dans le bécher sans

déplacer la couche de sable puis on dépose sur la surface une nouvelle couche de 2 cm de sable.

On laisse macérer pendant une nuit, au bout de ce temps la macération ainsi produite est siphonnée rapidement, l'extraction doit être continuée à une vitesse telle que les 2 litres de solution à la concentration analytique requise (4 g par litre de substances adsorbables par la poudre de peau) soient obtenus en 7 heures.

Lorsque l'on a recueilli les 150 premiers ml, la température du bain-marie doit être élevée à 50° et à cette température on recueille une nouvelle portion de 750 ml : la température doit enfin être portée rapidement à l'ébullition et la quantité nécessaire pour faire 2 litres est extraite à cette température.

Résultats

1) HUMIDITÉ : 9,89%.

2) DÉTERMINATION DES MATIÈRES SOLIDES TOTALES :

par évaporation au bain-marie, dans une capsule de verre, de 50 ml de la solution tannique rendue uniforme par agitation : soit : 25,48%.

3) MATIÈRES SOLUBLES TOTALES :

La solution primitive est filtrée sur papier filtre avec addition de kaolin, le filtrat doit être optiquement clair ; l'évaporation au bain-marie d'une partie aliquote et la pesée du résidu donnent : 23,90%.

4) INSOLUBLE APRÈS REFFROIDISSEMENT :

C'est la différence entre les matières solides totales et les matières solubles totales soit : 1,60%.

5) DÉTERMINATION DES NON-TANINS.

On détannise avec la poudre de peau préchromée. On opère dans une fiole conique de 250 ml avec 6,25 g de poudre de peau, on ajoute 100 ml de solution analytique. Après avoir fermé avec un bouchon de caoutchouc on agite mécaniquement pendant 20 minutes, on retire le récipient, on laisse reposer. On filtre sur entonnoir à plaque poreuse. Plusieurs filtrations sont nécessaires pour obtenir une liqueur limpide. On obtient par évaporation du filtrat un résidu correspondant à 14,25% de non-tanin.

6) TANINS.

C'est la différence entre les matières solubles totales et les non-tanins soit : 9,65%.

Par ailleurs les tanins ont été dosés par le réactif de Stiasny sur une portion aliquote de la même liqueur extractive.

Dans un premier temps on détermine la fraction des tanins précipitables par le réactif de Stiasny (formol chlorhydrique) : tanins catéchiques et catéchines, soit : 13,10% rapporté au poids sec et dans un second temps on obtient la fraction de tanins catéchiques non précipitables par la gélatine salée correspondant vraisemblablement à des formes moins condensées (catéchines) soit 7% du poids sec.

Les résultats obtenus par les méthodes d'adsorption par la poudre de peau et de précipitation par le formol chlorhydrique sont donc assez différents.

En raison de la variation importante de la teneur en tanins signalée par les auteurs américains, nous avons cru bon par la suite de répéter le dosage sur un échantillon provenant de la plante récoltée en France en juin 1961.

Les déterminations ont été effectuées séparément dans les tiges et dans les feuilles. A ce stade de la végétation ces deux organes sont à peu près en proportions égales.

Résultats obtenus par la méthode de Stiasny (par rapport à la plante sèche).

<i>Tanins totaux</i>	Tiges :	6,73%	} 11,83% (en moyenne)
	Feuilles :	16,94%	
<i>Catéchines</i>	Tiges :	6,38%	} 7,11% (en moyenne)
	Feuilles :	7,84%	

Nous voyons donc que la teneur en tanins totaux est plus élevée dans les *Lespedeza* cultivés en France que dans l'échantillon américain, mais il faut remarquer que ce dernier était récolté depuis sept ans, et que les tanins pouvaient être devenus, en partie, insolubles.

Recherche des dérivés flavoniques

Elle a été effectuée, sur un infusé à 5% de plante broyée, par la réaction de SHIBATA [159] dite de la cyanidine.

L'infusé est additionné d'une partie égale d'alcool chlorhydrique à 20% et de quelques copeaux de magnésium, il se développe au bout de quelques minutes une coloration, plus ou moins orangée suivant l'organe étudié, passant dans l'alcool amylique : la recherche dans les feuilles est positive, il se produit une coloration orangée intense.

En ce qui concerne la tige, seule la moitié supérieure donne une coloration nette, pour la partie inférieure, plus ou moins ligneuse, la réaction est presque nulle.

On trouve également des flavones dans les fleurs.

Dans les gousses mûres, dont les graines ont été séparées mécaniquement, nous n'avons pas mis en évidence de flavones

dans le péricarpe, par contre la recherche dans les graines s'avère positive.

Dans les racines que nous avons pu étudier sur un autre lot provenant de la culture en France, la réaction de la cyanidine négative fait conclure à l'absence de flavones.

Recherches des alcaloïdes

50 grammes de drogue grossièrement pulvérisée sont placés dans un flacon de 500 ml et imbibés avec de l'ammoniaque à 50% (25 ml environ). On ajoute 250 ml de mélange éther-chloroforme (3/1, en volumes). On laisse macérer 48 heures dans le flacon bouché en agitant fréquemment, on filtre alors dans une ampoule à décantation et on rince le marc avec 100 ml d'éther-chloroforme, le liquide extractif étant agité avec 25 ml d'acide sulfurique à 5%.

La solution aqueuse acide donne un louche avec les réactifs généraux des alcaloïdes (R. de MAYER, R. de BERTRAND) faisant conclure à la présence d'une faible quantité de substances basiques dans les tiges feuillées.

Etant donné la faible quantité de racines et de graines dont nous disposons lors des essais préliminaires, la recherche des alcaloïdes a été effectuée à partir de teintures au 1/10 dans l'alcool à 60°, par électrophorèse sur papier, dans l'appareil de MACHEBŒUF-RIBEYROTTE (Lerès constructeur).

Papier : Arches 301, (bandes de 27 cm sur 6 cm), 1 heure, électrolyte : acide formique à 5%, révélateur : réactif de Dragendorff [56], voltage : 18 volts/cm, taches de 40 μ l.

On observe dans ces conditions la migration de 2 taches vers la cathode pour la teinture de *Lespedeza capitata* au 1/2 dans l'alcool à 60° (tiges feuillées) ; dans la teinture de racines on retrouve la tache la plus extrême, ainsi que dans la teinture de graines. D'après la coloration obtenue après révélation (rose violacé) et le déplacement observé, la tache que l'on retrouve dans les racines, la plante feuillée et les graines s'est avérée être la choline (témoin 2,5 μ l d'une solution à 2,5%).

Dans les mêmes conditions, la tache de plus faible migration observée dans la teinture de plante feuillée se déplace sensiblement comme la trigonelline mais la coloration obtenue est différente.

En conclusion la majeure partie des substances azotées présentes chez le *Lespedeza*, semble constituée par de la choline.

Etude en chromatographie sur papier

Les teintures de *Lespedeza capitata* obtenues par lixiviation à partir de la plante fraîche (1), par stabilisation à l'alcool bouillant ou par macération à partir de la plante sèche, puis concentration au demi ont été étudiées en chromatographie sur papier. Les solvants ont été en chromatographie ascendante, le butanol acétique de Partridge (butanol-acide acétique-eau : 4/1/5) et en chromatographie descendante le mélange butanol-acide acétique-eau : 30/48/22. Les révélateurs employés ont été la potasse alcoolique à 5% et le chlorure ferrique en solution alcoolique à 2%.

Chromatographie ascendante

Papier Arches 301 (25 × 31 cm) - Température $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ - Durée 15 heures - Taches de 10μ l.

Rf	Visible	FeCl ₃	U.V.	U.V. après potasse alcoolique	Interprétation
0-0,25	brun-clair	bistre	brun	brun-foncé	Tanins
0,30		vert-gris	beige-rosé	jaune	} Dérivés Flavoniques
0,45		id.	id.	id.	
0,55	jaune pâle	id.	id.	id.	
0,75				fluorescence bleue-intense	Coumarines ?

Chromatographie descendante

Papier Arches 301 (55 × 14 cm) - Température $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ - Durée 17 h 30.

Rf	Visible	FeCl ₃	U.V.	U.V. après potasse alcoolique	Interprétation
0-0,25	brun-clair	bistre		brun foncé	Tanins
0,45		id.	brun-rosé	jaune	} Dérivés Flavoniques
0,65	jaune pâle	vert-gris	brun-rosé	jaune	
0,75	id.	id.	jaunâtre	jaune	
0,85			id.	fluorescence bleu intense	Coumarines ?

(1) Il s'agit d'une colature préparée avec la plante fraîche (tiges feuillées) par la méthode dite de la « percolation divisée » figurant au National Formulary (procédé C). [116], son degré alcoolique final est compris entre 67 et 73° selon la teneur en eau de la plante et la concentration est égale à 20% de la drogue sèche.

En conclusion, avec la teinture de *Lespedeza capitata* on obtient trois taches principales représentant vraisemblablement les dérivés flavoniques ; les Rf sont sensiblement les mêmes, quel que soit le mode de préparation de la teinture (la teinture préparée par stabilisation à l'alcool bouillant donne cependant des taches plus nettes). La tache principale est de Rf 0,45-0,55 en chromatographie ascendante, méthode qui a été presque exclusivement employée par la suite.

CHAPITRE III

ÉVALUATION COLORIMÉTRIQUE DES DÉRIVÉS FLAVONIQUES

La réaction de la cyanidine peut servir à une évaluation colorimétrique des flavonoïdes comme l'ont montré R. PARIS et Mlle J. CORNILLEAU [126].

Etablissement d'une courbe de référence

Le rutoside, rhamnoglucoside du quercétol a d'abord été employé comme témoin parce qu'il s'agit d'une substance aisée à se procurer à l'état pur ; cependant la coloration obtenue avec les flavonoïdes du *Lespedeza capitata* par la réaction de la cyanidine est nettement plus orangée que celle donnée par le rutoside ce qui nous a amené à faire parallèlement un témoin de lutéoline (tétrahydroxyflavone), donnant une coloration comparable ; il ne s'agissait malgré tout que d'une évaluation assez grossière de la teneur en dérivés flavoniques, mais elle a permis cependant de comparer divers échantillons de plantes, de teintures ou de précipités obtenus lors des extractions.

La gamme étalon est préparée à partir de solutions de rutoside et de lutéoline à 1‰ dans l'alcool à 60°, les tubes renfermant respectivement 0,25-0,50-0,75-1-1,50-1,75 et 2 ml de la solution mère soit 0,25 à 2 mg de substance flavonique.

Selon la technique préconisée par R. PARIS et Mlle J. CORNILLEAU, on ajoute dans chaque tube 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, 0,075 g de tournure de magnésium et l'on complète à 7 ml avec de l'alcool à 60° ; on laisse la coloration se développer 5 minutes après la fin du dégagement gazeux, puis on lit au photocolorimètre.

L'appareil utilisé est le colorimètre photoélectrique Electro-Synthèse, avec le filtre vert de longueur d'onde 530 mμ.

On ajuste le 100 du microampèremètre sur un témoin renfermant 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, 6 ml d'alcool à

60° et 0,075 g de tournure de magnésium ; le contenu de chaque tube est transvasé dans le tube colorimétrique pour la lecture. Grâce à l'abaque, le chiffre de transmission obtenu est transformé en densité optique et une courbe est tracée en portant en abscisse les quantités de flavonoïde et en ordonnée la densité optique. La réaction suit la loi de Beer-Lambert pour les concentrations indiquées.

Cette courbe servira pour tous les dosages ultérieurs.

Evaluation colorimétrique sur la plante sèche (Echantillon américain de 1950).

10 g de feuilles sèches pulvérisées sont traitées dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, par 250 ml d'alcool à 96°, deux fois une demi-heure à l'ébullition, on distille presque à sec, sous pression réduite, on reprend par 10 ml d'eau distillée chaude employée par petites portions, on filtre sur coton, à chaud. On effectue le dosage colorimétrique sur cet extrait aqueux.

Résultats : 1,06% de dérivés flavoniques (en rutoside) — 1,08% (en lutéoline) par rapport à la plante sèche.

La teneur en flavonoïdes dans les tiges entières est négligeable, la coloration obtenue étant presque nulle. Dans les fleurs sèches la teneur est de 0,13%, exprimée en rutoside. Elle est donc beaucoup plus faible que dans les feuilles.

Evaluation colorimétrique des dérivés flavoniques sur la plante fraîche récoltée à différentes époques

Nous avons opéré sur des échantillons du *Lespedeza capitata* cultivé en France.

La méthode suivante a été employée : 10 à 20 g de tiges feuillées sont stabilisées dans dix parties d'alcool éthylique à 96° bouillant, l'ébullition étant maintenue trente minutes ; après filtration la plante est séchée puis broyée et mise à bouillir une nouvelle demi-heure dans le même alcool. On filtre et on rince le marc avec un peu d'alcool. On distille presque à sec, sous pression réduite et on reprend immédiatement le résidu par le poids de plante d'eau bouillante, employée en plusieurs fractions. On filtre sur coton et on ajuste au volume donné.

On effectue le dosage comme précédemment.

Par ailleurs, la teneur en eau a été déterminée sur tous les échantillons par séchage à l'étuve à poids constant.

Résultats exprimés en rutoside et par rapport à la plante sèche.

- 1) Prélèvement du 12-5-57. Rejets d'un pied de 3 ans ; la plante feuillée à 15 cm de haut.
 — teneur en eau 75,06%.
 — dérivés flavoniques 1,40%.
- 2) Prélèvements du 10-6-57.
 Rejets d'un pied de un an - hauteur 17 cm.
 — teneur en eau 75%.
 — dérivés flavoniques 1%.
 Pied de 3 ans - hauteur 23 cm.
 — teneur en eau 74,5%.
 — dérivés flavoniques 1,08%.
 Pied de 6 ans - hauteur 34 cm.
 — teneur en eau 76,50%.
 — dérivés flavoniques 1,06%.
- 3) Prélèvements du 1^{er}-7-57.
 Pied de un an - hauteur 35 cm.
 — teneur en eau 65%.
 — dérivés flavoniques 1,21%.
 Pied de 2 ans - hauteur 40 cm.
 — teneur en eau 66,50%.
 — dérivés flavoniques 0,73%.
 Pied de 4 ans - hauteur 37 cm.
 — teneur en eau 63%.
 — dérivés flavoniques 0,58%.
 Pied de 7 ans - hauteur 52 cm.
 — teneur en eau (la plante avait séché partiellement quand le dosage a été effectué : 30%).
 — dérivés flavoniques 0,34%.

La teneur en dérivés flavoniques semble donc diminuer avec l'âge de la plante, fait probablement dû, en partie, à l'augmentation de la proportion de tige, les dérivés flavoniques disparaissant petit à petit dans la tige qui se lignifie.

Les proportions de tiges pour les échantillons étudiés sont les suivants :

Chez le *Lespedeza* de 1 an : 31% en poids.
 2 ans : 39% en poids.
 4 ans : 43% en poids.
 7 ans : 50% en poids.

Nous devons par conséquent tenir compte de ce fait dans l'extraction des flavonoides.

Par la suite, disposant du dérivé flavonique principal, le lespécapitoside pur, isolé par nous du *Lespedeza capitata*, nous

avons établi une nouvelle courbe de référence, les lectures ont été faites alors à l'électrophotomètre de Meunier avec le filtre n° 49 (longueur d'onde 490 m μ), pour lequel l'absorption est maximale.

De nouveaux prélèvements ont été faits à différents moments de la végétation sur des pieds de *Lespedeza capitata* cultivé depuis plusieurs années. Les dosages ont été alors effectués séparément sur les tiges et sur les feuilles.

Les résultats, rapportés comme précédemment à la plante sèche, sont consignés dans le tableau suivant :

Date de la récolte	Dates du semis					
	1957		1958		1959	
	Tiges	feuilles	Tiges	feuilles	Tiges	feuilles
15 mai.....	0,38 %	1 %	0,32 %	1,13 %	0,34 %	0,91 %
1 ^{er} juin	0,12 %	0,95 %	0,09 %	0,79 %	0,09 %	0,77 %
1 ^{er} juillet ...	0,29 %	0,88 %	0,29 %	0,99 %	0,27 %	1 %
15 septembre			0,13 %	0,98 %		

On voit que la teneur en flavonoïdes des feuilles est trois à quatre fois plus élevée que celle des tiges ; aussi les feuilles seules ont-elles été employées pour l'extraction des dérivés flavoniques.

CHAPITRE IV

EXTRACTION DES DÉRIVÉS FLAVONIQUES

A) A PARTIR DE LA PLANTE FRAICHE

1. Echantillon récolté en France en septembre 1957 avant la floraison

— Hauteur des pieds : 1 mètre environ.

— Teneur en eau (tige feuillée) : 58%.

Dès leur réception au laboratoire 4,850 kg de feuilles ont été plongés dans dix parties d'alcool éthylique à 95° bouillant dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux ; l'ébullition est maintenue une demi-heure ; on filtre bouillant ; les feuilles sont séchées, puis pulvérisées et la poudre de drogue est épuisée à nouveau une demi-heure à l'ébullition par le même alcool.

Toutes les colatures sont réunies et distillées sous pression réduite.

La solution est concentrée pour éliminer l'alcool, on ajoute alors au liquide encore bouillant de l'eau distillée froide qui précipite la chlorophylle. On filtre à chaud sur coton qui retient une masse n'adhérant pas au doigt, noirâtre. Après nouvelle filtration sur papier on obtient une liqueur jaune brun, limpide. Après 24 heures de repos au réfrigérateur il s'est formé un dépôt assez abondant qui est séparé sur entonnoir de Büchner, recueilli et placé sous vide rapidement, mais se résinifiant facilement. Un nouveau repos fait apparaître un précipité qui est recueilli, séché sous vide et pesé (2 g). La liqueur aqueuse est lavée à l'éther, la concentration de ce solvant n'amène la formation d'aucun précipité. On sépare 500 ml de liqueur aqueuse qui sont gardés au réfrigérateur sous éther. D'autre part, on épuise à froid le reste de la liqueur aqueuse, soit 1000 ml, par l'acétate d'éthyle à plusieurs reprises dans une ampoule à décantation ; l'acétate d'éthyle séparé (1 litre) est fortement coloré en jaune brun. Il donne une réaction de la cyanidine très positive mais la concentration à 50 ml sous pression réduite n'amène la séparation d'aucun précipité.

L'épuisement de la liqueur aqueuse par l'acétate d'éthyle est poursuivi d'une manière identique, le solvant est alors déshydraté (48 heures sur du sulfate de sodium pur, sec) puis concentré, ce qui n'amène la formation d'aucun précipité.

L'épuisement est alors continué avec de l'acétate d'éthyle contenant 5% d'alcool à 95° ; après déshydratation sur sulfate de sodium et concentration, il se sépare 0,19 puis 0,31 g d'un précipité brun clair donnant la réaction de la cyanidine.

Mais ces essais ne donnant que des résultats médiocres, la liqueur aqueuse est enfin épuisée par le *n*-butanol pur, qui, déshydraté sur sulfate de sodium et concentré sous vide, fournit un précipité nettement plus abondant (1,51 g puis 0,65 g) de couleur, brun clair, donnant une réaction de la cyanidine positive.

La solution aqueuse résiduelle est réunie à la portion gardée au réfrigérateur, elle est concentrée à environ 1 litre et épuisée à plusieurs reprises par de petites fractions de *n*-butanol. Les liqueurs butanoliques sont réunies, déshydratées sur sulfate de sodium et concentrées sous vide. Six épuisements d'un litre environ ont été effectués, chaque liqueur étant concentrée à 2 reprises (à la troisième concentration la liqueur se prend souvent en masse translucide).

Ces dérivés flavoniques bruts réunis (35,65 g) représentent 1,26% du poids sec de la plante.

2. A partir d'une teinture préparée à partir de la plante fraîche suivant la méthode du National Formulary (voir p. 59).

Un litre de la teinture est concentrée presque à sec sous pression réduite. On reprend alors en plusieurs fois par de l'eau bouillante (un litre en tout), on filtre sur coton, qui retient une masse épaisse, vert noir, renfermant de la chlorophylle, des stérols, et ne donnant pas la réaction de la cyanidine.

Après refroidissement, la liqueur aqueuse est portée au réfrigérateur, le lendemain il s'est formé un léger dépôt qui est centrifugé, ce précipité donne une réaction positive de la cyanidine; mis sous vide phosphorique il s'est résinifié et n'a pu être étudié ultérieurement.

— 375 ml de liqueur aqueuse (correspondant à 75 g de plante sèche) sont épuisés dans une ampoule à décantation.

1) par de l'éther éthylique employé par fractions de 50 ml jusqu'à ce que le solvant extractif soit incolore (6 épuisements) l'éther se colore fortement en vert, les liqueurs éthérées sont réunies, elles donnent une réaction de la cyanidine positive (coloration orange passant dans l'alcool amylique).

10 ml sont évaporés à sec dans une ampoule donnant un résidu : A.

Le reste des liqueurs éthérées est concentré au quart et abandonné au réfrigérateur après refroidissement. Aucun dépôt ne se produit après plusieurs mois.

2) La liqueur aqueuse traitée par l'éther est ensuite épuisée par l'acétate d'éthyle par fractions de 50 ml jusqu'à cessation de coloration; l'acétate d'éthyle se colore fortement en brun jaune et quinze épuisements sont nécessaires pour obtenir un solvant extractif à peu près incolore. Toutes les liqueurs d'acétate d'éthyle réunies donnent une réaction de la cyanidine fortement positive.

10 ml sont évaporés à sec dans une capsule donnant un résidu : B.

3) Le reste des liqueurs éthéro-acétiques est concentré sous pression réduite jusqu'à début de trouble et versé aussitôt dans un flacon sec et froid où il se produit instantanément un précipité brun jaunâtre, floconneux qui se rassemble au fond du flacon : D. Après refroidissement le flacon est porté au réfrigérateur.

La liqueur aqueuse résiduelle est conservée : 10 ml évaporés à sec donnent le résidu C. Les trois résidus A, B et C ont été examinés en chromatographie sur papier après dissolution dans 1 ml d'alcool à 95°.

D'autre part le précipité D obtenu dans l'acétate d'éthyle est recueilli par centrifugation et séché sous vide phosphorique.

On obtient 0,17 g (soit 0,22% rapporté au poids sec) d'un produit pulvérulent brun clair.

Les eaux mères sont concentrées une seconde fois sous pression réduite jusqu'à nouvelle précipitation, puis portées au réfrigérateur. On a un nouveau précipité : D' de 0,25 g, le rendement final est donc de 0,42% g soit environ 0,56% de la plante sèche.

Les deux précipités D et D' ont été réunis, il s'agit d'un produit brun clair à chamois, donnant une réaction de la cyanidine assez intense, de couleur orangée et passant dans l'alcool amylique.

Etude en chromatographie sur papier des extraits A, B, C et des précipités D et D' obtenus précédemment.

Conditions : chromatographie ascendante (méthode décrite p. 59).

Substance	Rf	Visible	U.V.	U.V. + KOH	Interprétation
A	0,65	—	jaune vert	jaune-vert fluorescent	} Dérivés flavoniques Coumarines ?
	0,85	—	id.	id.	
	0,95	—	bleu-vert	bleu-vert fluorescent	
B	0-0,25	brun	brun	brun foncé	} Tanins Dérivés flavon. Coumarines ?
	0,45-0,65 0,90-0,95	jaune pâle —	brun rosé bleu-vert	jaune orangé bleu-vert fluorescent	
C	0-0,25	brun	brun	brun foncé	} Tanins Dérivés flavoniques Coumarines ?
	0,25-0,45	—	—	trainée jaune	
	0,50-0,55	jaune pâle	brun-rosé	jaune intense	
	0,65 0,90	— —	jaune bleu-vert	jaune-vert fluorescence	
D D'	0-0,25	brun	brun	brun foncé	} Tanins Dérivés flavoniques
	0,30	—	brun-rosé	jaune	
	0,35-0,55	—	—	jaune intense	

B) A PARTIR DE LA PLANTE SÈCHE...

1) Un essai préliminaire a été effectué sur 350 g de feuilles sèches pulvérisées (échantillon américain de 1950) qui ont été épuisés successivement par différents solvants dans un appareil de Soxhlet.

a) Ether de pétrole

Après 3 heures d'épuisement le solvant passe incolore, la liqueur extractive est colorée en vert foncé : par évaporation d'une

partie aliquote dans un cristalliseur taré, on obtient un extrait sec représentant 1,65% de la plante sèche.

Ce résidu, gras, jaune vert, est constitué par de la chlorophylle, des matières grasses et des stérols ; ceux-ci ont été mis en évidence par la réaction de LIEBERMANN (chloroforme, anhydride acétique et acide sulfurique concentré) : coloration vert foncé ; l'acide sulfurique concentré donne une coloration brun-vert ; le trichlorure d'antimoine en solution chloroformique produit une coloration vert intense (caroténoïdes ?). D'autre part, la réaction de la cyanidine négative fait conclure à l'absence de dérivés flavoniques dans cet extrait.

b) Chloroforme

Après 5 h 30 de marche continue l'épuisement est complet, on obtient un résidu sec d'évaporation jaune vert représentant 1,88% du poids sec.

La réaction des flavonoïdes est négative (cyanidine), celle des stéroïdes est positive (LIEBERMANN), avec le trichlorure d'antimoine on obtient comme précédemment une coloration verte (présence de caroténoïdes ?).

c) Ether

Après 5 h d'épuisement, le solvant passe incolore, le résidu obtenu est plus clair que les précédents (rendement 0,25% du poids sec).

La réaction de la cyanidine est toujours négative, la réaction de Liebermann encore positive.

d) Acétate d'éthyle

Par un premier épuisement de 2 h 30, on obtient un liquide d'extraction jaune brun, limpide, donnant une réaction de la cyanidine fortement positive, de coloration orangée, passant dans l'alcool amylique.

Les liqueurs sont distillées sous pression réduite jusqu'à début de trouble, et portées au réfrigérateur après refroidissement.

Un premier précipité de teinte chamois est recueilli par centrifugation, séché sous vide phosphorique et pesé : 0,48 g (rendement 0,15%).

Par nouvelle concentration un deuxième précipité se forme : 0,46 g soit 0,14%.

Après un second épuisement de 3 h 30 jusqu'à début de trouble, les liqueurs extractives distillées sous pression réduite fournissent un précipité de 0,40 g soit 0,12%. Une deuxième concentration des liqueurs résiduelles n'amène pas de nouvelle précipitation.

En définitive l'épuisement par l'acétate d'éthyle donne 0,41% d'un produit pulvérulent, brun clair, donnant une réaction de la cyanidine fortement positive (dérivés flavoniques), avec le chlorure ferrique dilué une coloration brun verdâtre indiquant la présence de dérivés flavoniques polyhydroxylés ou de tanins catéchiques ; ces derniers furent par ailleurs mis en évidence par la formation de phlobaphène ou rouge catéchique par ébullition avec de l'acide chlorhydrique concentré. L'extrait sec est de 0,50% rapporté au poids sec.

e) L'épuisement par l'acétate d'éthyle est suivi de celui par l'acétone pendant 3 heures. Le résidu d'évaporation de ce solvant est de 2,10% du poids sec d'un produit donnant une réaction positive au chlorure ferrique, et donnant des phlobaphènes (tanins catéchiques). Par concentration de la liqueur extractive qui donne une réaction de la cyanidine positive il n'apparaît pas de précipité.

f) On continue l'épuisement pendant 5 h avec de l'alcool éthylique à 90°, la liqueur extractive laisse un résidu sec (1,30% de la plante sèche).

Les liqueurs alcooliques présentent une réaction de la cyanidine positive mais les précipités obtenus par concentration (0,08 g puis 0,14 g soit 0,07%) ne la donnent que très faiblement.

En conclusion, l'acétate d'éthyle employé après l'éther de pétrole, le chloroforme et l'éther, permet d'extraire du *Lespedeza capitata* sec une petite quantité (0,41%) de dérivés flavoniques bruts accompagnés d'une certaine quantité de tanins.

L'acétone et l'alcool éthylique employés ensuite ne permettent plus de séparer des dérivés flavoniques en quantité appréciable.

Le produit brut ainsi obtenu a été étudié ultérieurement en chromatographie sur papier : on voit deux taches principales de Rf 0,45 et 0,60 qui représentent les dérivés flavoniques et une trainée brune du départ à 0,25 environ, correspondant aux tanins.

2) L'extraction a été effectuée à partir d'un kilo de feuilles sèches récoltées en France en 1959.

Il faut distinguer deux temps : le dégraissage de la drogue (dans l'appareil de DAMBRUN) et l'extraction proprement dite (appareil de SOXHLET).

Le premier est important pour l'isolement final du principe flavonique sous une forme assez pure.

Après broyage des feuilles la poudre obtenue est soumise à deux déterminations :

- Teneur en eau : 9,89 %.
- Cendres : 7,16 %.

a) Dégraissage

Le dégraissage est effectué dans l'extracteur de DAMBRUN, permettant de traiter plusieurs kilogrammes de poudre ; cet appareil est constitué, à la partie inférieure, par un grand réservoir métallique où le solvant est porté à l'ébullition, surmonté d'un manchon cylindrique fermé à sa partie supérieure par un condenseur, au-dessous duquel se trouve un panier à fond perforé dans lequel est tassée la poudre.

L'épuisement est donc fait par un solvant bouillant, l'appareil s'apparentant plus au système de KUMAGAWA qu'à celui de SOXHLET.

On opère d'abord à froid en épuisant la poudre par 5 litres d'éther de pétrole ; au bout d'une heure, l'éther de pétrole est déjà fortement coloré au vert. On le soutire. On distille, les résidus sont conservés.

On épuise alors le marc par 5 litres d'éther de pétrole à chaud, pendant 5 h en marche continue. Au bout de ce temps, l'éther de pétrole soutiré est redistillé jusqu'à obtention d'un résidu sec (rendement 18,25 ‰).

Après macération du marc pendant 48 h à la température du laboratoire dans 5 litres de chloroforme, les liqueurs chloroformiques sont extrêmement foncées. On opère alors à chaud avec du chloroforme neuf pendant 5 heures de marche continue. Le résidu chloroformique final est de 20,06 ‰. Le marc dégraissé par l'éther de pétrole et le chloroforme est alors mis à sécher avant de passer au stade suivant du dégraissage, qui va se faire par l'éther sulfurique dans un appareil de SOXHLET.

Cette opération est effectuée pendant 6 h de marche continue après une macération de 36 h.

En pratique, quatre appareils de SOXHLET sont utilisés, 250 g de drogue étant traités dans chacun d'eux.

Les liqueurs éthérées sont réunies, concentrées jusqu'à siccité, le résidu est repris à chaud, immédiatement, par 15 ml environ d'alcool éthylique à 50°, et filtré sur papier. La liqueur obtenue, brun-rouge, donne une réaction de la cyanidine très intense. Au bout de 15 à 30 jours un dépôt brun s'est formé dans le fond du flacon, et sur les parois se sont déposés de petits cristaux jaunes, qui sont recueillis après décantation du liquide.

Ces substances seront étudiées plus loin.

Après épuisement par l'éther éthylique, le marc est mis à sécher complètement avant d'aborder le deuxième temps : l'extraction proprement dite, qui se fait par l'acétate d'éthyle.

b) Extraction proprement dite

Tous les épuisements par l'acétate d'éthyle se font dans un appareil de SOXHLET pendant 6 heures, après une macération de 36 heures. On fait trois épuisements par l'acétate d'éthyle.

Chaque liqueur extractive est concentrée sous pression réduite jusqu'à début de précipitation, la liqueur concentrée est alors versée dans un flacon propre et sec et abandonnée à la température du laboratoire avant d'être placée au réfrigérateur où le précipité formé se dépose. Pour le dernier liquide d'épuisement le précipité reste fréquemment en suspension.

Après quelques jours, les précipités formés sont recueillis, ils sont immédiatement lavés sur le filtre avec de l'acétate d'éthyle et mis aussitôt sous vide phosphorique.

Après séchage ils sont recueillis et pesés.

Résultats

	Poids du précipité
— 1 ^{er} épuisement :	
première concentration	9,31 g
deuxième concentration	4,44 g
— 2 ^e épuisement :	
première concentration	7,06 g
deuxième concentration	2,80 g
— 3 ^e épuisement :	
première concentration	3,53 g
deuxième concentration	nul

Soit au total 27,14 g de précipité flavonique brut pour un kilo de feuilles sèches, donc environ 3% rapporté au poids sec.

3) Une seconde extraction, sur des feuilles sèches récoltées en France en 1960, a été faite en utilisant les mêmes solvants et uniquement dans l'appareil de DAMBRUN.

— Humidité : 8,80 %.

— Cendres : 5,50%.

La méthode précédente est répétée : éther de pétrole à froid puis en marche continue ainsi que pour le chloroforme et l'éther éthylique, mais il semble nécessaire d'effectuer les épuisements par l'acétate d'éthyle à 6 reprises en renouvelant le solvant.

Les remarques suivantes peuvent être faites :

— le premier épuisement par l'acétate d'éthyle pendant 5 h en marche continue fournit une liqueur encore verte et donnant un faible précipité après concentration. Pour obtenir une bonne précipitation, il semble qu'au moins au laboratoire, l'épuisement de la drogue par l'acétate d'éthyle donne de meilleurs résultats dans l'appareil de SOXHLET que dans celui de DAMBRUN.

— il faut noter aussi que dans ce dernier appareil la tempé-

rature d'épuisement est plus élevée que dans celui de SOXHLET. Six épuisements ont été effectués par l'acétate d'éthyle :

Résultats

	Poids du précipité
— 1 ^{er} épuisement :	
première concentration	0,53 g
deuxième concentration	0,49 g
— 2 ^e épuisement :	
première concentration	4,21 g
— 3 ^e épuisement :	
première concentration	5,61 g
— 4 ^e épuisement :	
première concentration	3,76 g
2 ^e , 3 ^e et 4 ^e épuisements :	
deuxième concentration	6,88 g
— 5 ^e épuisement :	
première concentration	4,23 g
deuxième concentration	1,60 g
— 6 ^e épuisement :	
première concentration	3,36 g
deuxième concentration	nul

Soit au total 30,67 g de précipité flavonique brut pour un kilo de feuilles sèches (3,40% rapporté au poids sec).

Les résultats globaux sont donc comparables aux précédents, mais la purification ultérieure a semblé plus difficile.

CHAPITRE V

ETUDE ET PURIFICATION DES FLAVONOÏDES BRUTS

Les précipités obtenus par concentration des liqueurs *n*-butanol (voir p. 64) et d'acétate d'éthyle (voir p. 71) se présentent après séchage dans le vide phosphorique comme des poudres légères, bistre clair, de saveur astringente et amère.

Ces substances donnent une réaction de la cyanidine fortement positive, de coloration orangée ; si l'on remplace le magnésium par le zinc, la coloration est rose violacée.

Avec le chlorure ferrique on obtient une coloration verte virant immédiatement au brun foncé et suivie de floculation.

En milieu alcalin (lessives de soude ou de potasse) il se développe une intense coloration jaune.

L'addition de solution alcoolique d'acétate de magnésium à 5% à une solution méthanolique du produit étudié, produit une fluorescence jaune en lumière ultra-violette.

En chromatographie sur papier, dans les conditions décrites précédemment (p. 59), ces substances, en solution à 1% dans le méthanol, à la dose de 10 μ l donnent 3 taches, révélées en jaune

par la potasse alcoolique, de Rf 0,30, 0,45, et 0,65. Il existe en outre, une légère traînée brunâtre correspondant aux tanins, de la ligne de départ à Rf 0,20 (cette traînée est plus importante dans le précipité brut provenant du *n*-butanol).

Evaluation colorimétrique des précipités bruts

Elle a été effectuée par la méthode déjà utilisée, les différents précipités obtenus dans l'acétate d'éthyle ayant été examinés séparément.

Pour un mg de précipité brut, résultats exprimés en lutéoline (colorimètre Electro-Synthèse) :

— Précipité obtenu dans le *n*-butanol : 0,17 mg.

— Précipités obtenus dans l'acétate d'éthyle (extracteur de DAMBRUN) :

1 ^{er} épuisement	
1 ^{re} concentration	0,50 mg
2 ^e concentration	0,57 mg
2 ^e épuisement	
1 ^{re} concentration	0,38 mg
2 ^e concentration	0,53 mg
3 ^e épuisement	
1 ^{re} concentration	0,53 mg
2 ^e concentration	0,70 mg
4 ^e épuisement	
1 ^{re} concentration	0,38 mg
2 ^e concentration	pas de précipité

Pour chaque épuisement il est intéressant de remarquer que le précipité de deuxième concentration est souvent plus riche en dérivés flavoniques que celui provenant de la première concentration.

Par la suite, nous avons poursuivi les épuisements dans l'appareil de DAMBRUN de façon à obtenir le maximum de précipité flavonique brut (6 à 7 épuisements).

Tous les précipités de l'acétate d'éthyle ont été réunis et le dosage colorimétrique effectué sur ces échantillons moyens, en utilisant alors comme appareil le Photocolorimètre de MEUNIER et comme étalon le lespécapitoside, flavonoïde principal obtenu à l'état cristallisé (voir p. 83).

Les chiffres obtenus alors sont nettement plus faibles : 0,25 à 0,40 mg par mg de précipité brut.

Les résultats précédents semblent dus moins aux différences d'appareillage et de substances de référence qu'au fait que les épuisements finaux ont entraîné des impuretés (tanins) diminuant la proportion de flavonoïdes dans les précipités totaux.

Les précipités bruts obtenus ne renferment donc que 25 à

40% de flavonoïdes et encore il ne s'agit pas d'un seul constituant puisque la chromatographie révèle la présence de trois taches dont une principale, aussi était-il nécessaire de purifier ces flavonoïdes bruts.

PURIFICATION DES FLAVONOÏDES BRUTS

ESSAIS DE PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ BRUT OBTENU PAR CONCENTRATION DES SOLUTIONS *n*-BUTANOL ET DES PRÉCIPITÉS BRUTS DE L'ACÉTATE D'ÉTHYLE

A. — PRÉCIPITÉ BRUT OBTENU DANS LE *n*-BUTANOL

I. — Plusieurs essais ont été effectués sur des colonnes adsorbantes

1) COLONNE DE CELLULOSE

On emploie un cylindre de verre de 55 cm de long et de 20 mm de diamètre intérieur, fermé à son extrémité inférieure par un robinet de verre ; après avoir disposé un tampon de coton, on tasse régulièrement 50 g de poudre de cellulose DURIEUX dans la colonne, ce qui emplit les deux tiers inférieurs.

2,50 g de précipité flavonique brut sont alors mélangés intimement avec 2,50 g de poudre de cellulose, le tout est déposé à la partie supérieure de la colonne et recouvert d'un tampon de coton. Les solvants suivants ont été utilisés pour l'épuisement :

a) *Ether de pétrole.*

L'écoulement est réglé à une goutte par seconde ; par fractions de 25 ml on recueille 275 ml de ce solvant qui passe finalement incolore.

Par évaporation on obtient sur les parois du cristalliseur des gouttelettes huileuses (en tout 24 mg), incolores, donnant faiblement la réaction de LIEBERMANN, se colorant en brun par addition d'acide sulfurique et ne donnant pas la réaction de la cyanidine.

b) *Chloroforme.*

Quantité de solvant employé : 250 ml.

Résidu total : 33 mg.

La réaction de LIEBERMANN est positive, la recherche des dérivés flavoniques est négative.

c) *Ether éthylique.*

Quantité de solvant : 350 ml.

Il ne reste pas de résidu appréciable par évaporation de l'éther.

d) *Ether éthylique-acétate d'éthyle à parties égales.*

Quantité utilisée : 200 ml.

Résidu très faible : 4 mg qui se colore en jaune par addition de soude.

e) *Acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle renfermant 1% de méthanol.*

Quantité de solvant utilisée : 500 ml et 400 ml.

Résidu total : 650 mg.

Réaction de la cyanidine positive.

f) *Acétate d'éthyle renfermant 5% de méthanol.*

Quantité utilisée : 2300 ml.

Résidu : 690 mg.

Réaction de la cyanidine positive.

Les produits obtenus par évaporation de l'acétate d'éthyle pur ou additionné de méthanol sont analogues. Il s'agit de poudres blanc jaunâtre présentant une réaction de la cyanidine orangée.

En chromatographie sur papier dans les mêmes conditions que précédemment, on obtient les mêmes taches de dérivés flavoniques qu'avec le produit brut de départ, mais la traînée de tanins a disparu ; cette méthode n'a donc pas permis de séparer les différents dérivés flavoniques mais seulement de les purifier en partie.

2) COLONNE DE CELLULOSE TAMPONNÉE

Ces essais ont été réalisés dans l'appareil collecteur de fractions: TECHNICON.

On a utilisé une colonne de poudre de cellulose imprégnée d'un tampon phosphaté.

Trois tampons ont été employés en solution 0,5 M selon la méthode d'EVANS et PARTRIDGE [50] décrite en particulier par PALMER [122], de pH 6,6, 6 et 5,4.

30 g de cellulose sont soigneusement mélangés avec 15 g de la solution tampon. Le produit flavonique brut (1 g) est mêlé à un peu de cellulose et déposé à la partie supérieure de la colonne. Les solvants sont préalablement saturés du tampon utilisé. On recueille des fractions de 5 ml.

a) pH 6,6.

On fait passer successivement du chloroforme contenant 1%, 3%, 5%, 10% d'alcool méthylique ; par évaporation des fractions recueillies, on met en évidence la présence de stérols par la réaction de LIEBERMANN ; la recherche des flavones est négative. On élue alors avec du *n*-butanol. Les fractions sont colorées en jaune,

la colonne également. Les trois premières fractions colorées ne donnent pas de taches en chromatographie papier. Les fractions sont examinées de dix en dix par chromatographie sur papier pour comparer leur richesse et leur composition en dérivés flavoniques. De la fraction 10 à la fraction 70 on voit les spots de Rf 0,72 - 0,80 et 0,90.

La première tache jaune orangé de Rf 0,55 n'est visible que pour les fractions 70 à 110.

Au-delà de la centième fraction les autres taches s'affaiblissent puis disparaissent progressivement. On obtient, par évaporation, des résidus jaunes donnant la réaction de la cyanidine. Il n'a pas été possible d'obtenir dans ces conditions une bonne séparation des dérivés flavoniques

b) *pH* 6.

On emploie d'abord le chloroforme pur. La première fraction colorée en jaune donne la réaction des stérols ; les autres sont incolores.

Le chloroforme est alors additionné de 2, 3, 5, puis 10% de méthanol : absence de dérivés flavoniques par évaporation du solvant ; le butanol pur, le butanol renfermant 50% de chloroforme, n'amènent pas de séparation ; le butanol contenant 10% de chloroforme ou 50% d'acétate d'éthyle n'élue surtout que les taches 2 et 3. Ces résultats imparfaits nous ont conduits à essayer le troisième tampon.

c) *pH* 5,4.

Plusieurs solvants ont été utilisés successivement pour l'élu-tion.

— le chloroforme pur : la première fraction est colorée en jaune et la réaction de LIEBERMANN positive indique la présence de stérols.

— l'éther éthylique est employé ensuite. Par évaporation des fractions il reste un résidu très léger, odorant, qui se colore en jaune par la soude, mais qui donne une réaction de la cyanidine négative.

En chromatographie sur papier, on met seulement en évidence la quatrième tache, bleue aux U V de Rf 0,90 (coumarines?).

— l'acétate d'éthyle pur : la première fraction est colorée en jaune mais ne donne aucun spot en chromatographie.

Le résidu de la onzième fraction donne une réaction de la cyanidine positive et se colore nettement en jaune par la soude ; la chromatographie sur papier fait apparaître la troisième tache, jaune de Rf 0,80, et légèrement la quatrième, bleue aux U.V. Rf : 0,90.

— l'acétate d'éthyle à 2% de méthanol élue, au moins dans les premières fractions, la deuxième tache jaune, de Rf 0,72 et la quatrième, bleue.

— l'acétate d'éthyle à 5% de méthanol n'extrait plus de quantités appréciables de dérivés flavoniques. Par contre, l'acétate d'éthyle contenant 50% d'acétone, les élue sans aucune séparation et on retrouve les quatre taches du produit brut par la chromatographie des résidus d'évaporation.

Cette méthode ne donnant pas de résultats nets n'a pas été poursuivie.

II. — Essai de purification par épuisement dans une ampoule à décantation de la solution aqueuse du précipité brut

Quelques grammes de précipité brut ont été dissous dans l'eau chaude ; la solution filtrée a été épuisée successivement dans une ampoule à décantation par l'acétate d'éthyle, l'acétate d'éthyle renfermant 0,25 %, 2 %, 5 %, 10 % de butanol. Des portions aliquotes des solvants ont été évaporées et les résidus examinés en chromatographie sur papier. Toutes les taches du précipité brut sont retrouvées. Il n'y a donc eu aucun fractionnement.

Par contre, si l'épuisement est effectué par l'éther sulfurique, l'éther-chloroforme à parties égales, l'éther sulfurique renfermant 10% d'acétate d'éthyle, les dérivés flavoniques ne sont pas extraits en quantité sensible de la solution aqueuse.

Ces essais ont donc été abandonnés.

B) PRECIPITE BRUT OBTENU DANS L'ACETATE D'ETHYLE

I. — Epuisement par différents solvants dans un micro-extracteur

Celui-ci est constitué par une fiole conique à large encolure surmontée d'un petit réfrigérant auquel s'adapte une nacelle dont le fond est une plaque de verre fritté.

1 g de produit brut a été mélangé avec 30 à 40% de Kieselguhr (Hyflo-Super Cel) (1) placé dans une nacelle et épuisé successivement par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'éther, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol et l'éthanol. Chaque épuisement dure 3 heures. Les trois premiers solvants n'entraînent que des traces d'impuretés ; l'acétate d'éthyle dissout une petite quantité de substance, qui précipite par concentration du solvant.

(1) JOHNS-MANVILLE Products.

Le produit obtenu présente, comme la substance de départ, trois taches en chromatographie sur papier.

Enfin l'acétone, le méthanol et l'éthanol dissolvent la totalité du précipité sans permettre aucune purification.

Cette méthode a donc été abandonnée.

II. — Essai de cristallisation fractionnée dans différents solvants

Quelques essais préliminaires avec de l'acétone pure, de l'acétone renfermant 20% ou 80% d'eau, l'alcool à 95° et à différents titres, ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus avec un alcool de titre compris entre 30 et 50°.

Le précipité brut est donc dissous à l'ébullition dans le minimum d'alcool à 40°, après filtration rapide à chaud sur verre fritté ce qui retient une proportion importante d'impuretés, le filtrat est abandonné à la température du laboratoire. Il se forme un précipité au bout de quelques heures. Ce premier précipité purifié est recueilli et mis à sécher sous vide phosphorique. En chromatographie sur papier il fournit une tache principale de Rf 0,50 et deux taches légères de Rf 0,35 et 0,65.

Après un second traitement analogue, le précipité, représentant environ le dixième du produit brut, ne donne plus qu'une seule tache en chromatographie (Rf 0,50) dans les mêmes conditions que précédemment (voir p. 59). Les taches de Rf 0,30 et 0,65 se retrouvent très intenses dans les premières eaux-mères ainsi que la traînée de tanins ; les deuxièmes eaux-mères ne donnent que trois taches très faibles (Rf 0,30, 0,50 et 0,65).

Le produit purifié se présente sous forme d'une poudre jaune pâle, légère, formée de très fines aiguilles de P.F. = 285-290° (décomposition) (Bloc Maquenne).

La réaction de la cyanidine est orangée très intense, le chlorure ferrique donne une teinte verte virant au brun vert.

Pour comparer la pureté des flavonoïdes recristallisés, on peut utiliser, plutôt que l'évaluation colorimétrique, le dosage spectrophotométrique. Ainsi que nous le verrons plus loin (voir p. 80) le spectre ultra-violet du flavonoïde principal du *Lespedeza capitata* ou lespécapitoside présente son plus grand maximum d'absorption à 350 mμ.

50 mg de lespécapitoside (cristallisé plusieurs fois dans l'alcool à 40°) ont été dissous dans de l'alcool à 95° purifié pour spectrophotométrie et le volume complété à 100 ml. Dans trois fioles jaugées de 50 ml sont introduits respectivement 1 ml, 1,5 ml et 2 ml de cette solution mère et, après avoir ajusté à 50 ml, la densité optique de ces solutions a été déterminée, à l'aide du spec-

trophotomètre GRAPHI-SPECTRAL JOUAN, à 350m μ , dans des cuves de silice de 1 cm.

	Densité optique D	Coefficient d'extinction spécifique E
Solution à 1/50 000	0,965	4825
Solution à 1/66 666	0,723	4810
Solution à 1/100 000	0,476	4760

Une densité optique voisine de 0,5 étant recommandée pour les dosages spectrophotométriques, on opérera avec une solution de flavonoïdes au 1/100 000 dans de l'alcool à 95° purifié et on pourra appliquer la formule donnant la concentration de la substance en solution dans de l'alcool à 95° en fonction de la densité optique au maximum d'absorption (350 m μ) sous 1 cm d'épaisseur :

$$Cg \text{ 1000 ml} = \frac{D}{E}$$

CHAPITRE VI

ETUDE DU FLAVONOÏDE PRINCIPAL OU LESPECAPITOSIDE

I — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

Description

Le produit précédemment obtenu à l'état cristallisé dans l'éthanol à 40° puis dans l'acétone contenant 10% d'eau, se présente sous forme de très fines aiguilles jaune pâle ; suivant la température et la vitesse de cristallisation ces aiguilles sont plus ou moins longues et effilées ou groupées en amas.

Elles ne possèdent ni odeur ni saveur.

Point de fusion

Il a été déterminé selon trois techniques différentes.

— Le point de fusion instantané (bloc Maquenne) est peu net, il y a décomposition. Il est compris entre 285° et 290° pour la substance cristallisée dans l'éthanol à 40° et le produit recristallisé dans l'acétone contenant 10% d'eau.

— Au microscope à platine chauffante de Reichert on obtient des valeurs nettement plus basses : 240°-242°,

— Le banc de Köfler fournit des résultats intermédiaires : 245°-248°.

La substance cristallisée, séchée sous un vide de 20 mm de Hg en présence d'anhydride phosphorique, à la température d'ébullition du xylène (138°), fond à 245° (Reichert) et à 278° (bloc Maquenne).

Perte de poids

Nous avons étudié la perte de poids de la substance cristallisée, chauffée sous 20 mm de mercure en présence d'anhydride phosphorique, pendant 2 heures, aux températures d'ébullition des solvants suivants :

Benzène : 80°	2,26%
Toluène : 110°	0,80%
Xylène : 137-142°	0,94%

soit une perte de poids totale de 4%

Pouvoir rotatoire

La détermination du pouvoir rotatoire a été faite sur une solution à 1°/100 dans l'éthanol à 60° en tube de 1 dm. On ne peut opérer en solution plus concentrée étant donné la faible solubilité de la substance et sa coloration jaune vif. Dans ces conditions, le pouvoir rotatoire est pratiquement nul.

Il n'est pas possible d'opérer dans la pyridine qui donne une solution jaune foncé.

Spectre ultra-violet (fig. 11).

Il a été déterminé au moyen du spectrophotomètre UNICAM S.P. 500 sur une solution à 1/50 000 dans l'alcool à 96°.

L'absorption débute à 225 mμ, il y a un premier maximum à 260 mμ, une inflexion à 270 mμ, et un deuxième maximum à 350 mμ, puis la courbe décroît assez rapidement d'une façon continue.

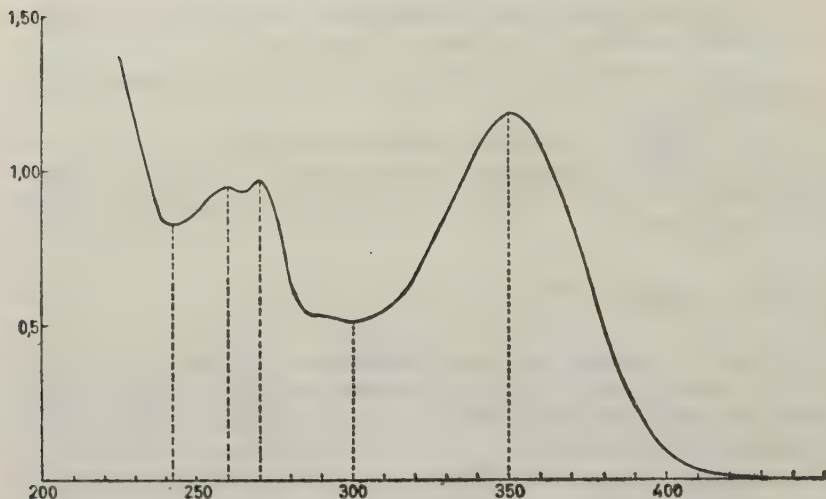


Fig. 11. — Spectre ultra-violet du Lespécapitoside (solution au 1/50 000° dans l'alcool).

En abscisse : longueur d'onde en $m\mu$.

En ordonnée : densité optique.

Spectre infrarouge (fig. 12)

Le flavonoïde purifié en suspension dans le Nujol a été examiné avec l'appareil de BAIRD.

On remarque une bande d'absorption à $2,9\mu$ correspondant aux groupements hydroxyles phénoliques et la bande à $6,1-6,2\mu$ aux groupements carbonyles ; les bandes à $9,3-9,7-10,2-10,4\mu$ représenteraient les groupements hydroxyles de la chaîne sucrée. Enfin les bandes à $11,9$ et $12,9\mu$ seraient dues aux substitutions hydroxylées du groupement phényle latéral.

Les bandes à $3,5$, $6,9$, et $7,3\mu$ proviennent de l'absorption du Nujol.

Solubilités

Le flavonoïde purifié est insoluble dans l'éther de pétrole, le chloroforme, pratiquement insoluble dans l'éther sulfurique, très peu soluble dans l'acétate d'éthyle, l'acétone et l'eau froide, plus soluble dans les liqueurs alcalines, l'alcool éthylique et l'alcool méthylique, surtout à l'ébullition, et assez soluble dans le propylène glycol et l'éthylène glycol.

Déterminations quantitatives : la méthode par saturation a été utilisée ; le solvant employé (15 ml) est introduit dans une fiole conique, on ajoute une quantité de substance finement pulvérisée suffisante pour obtenir une solution saturée au bain-marie bouillant ; le tout est alors maintenu 2 heures dans un cristal-

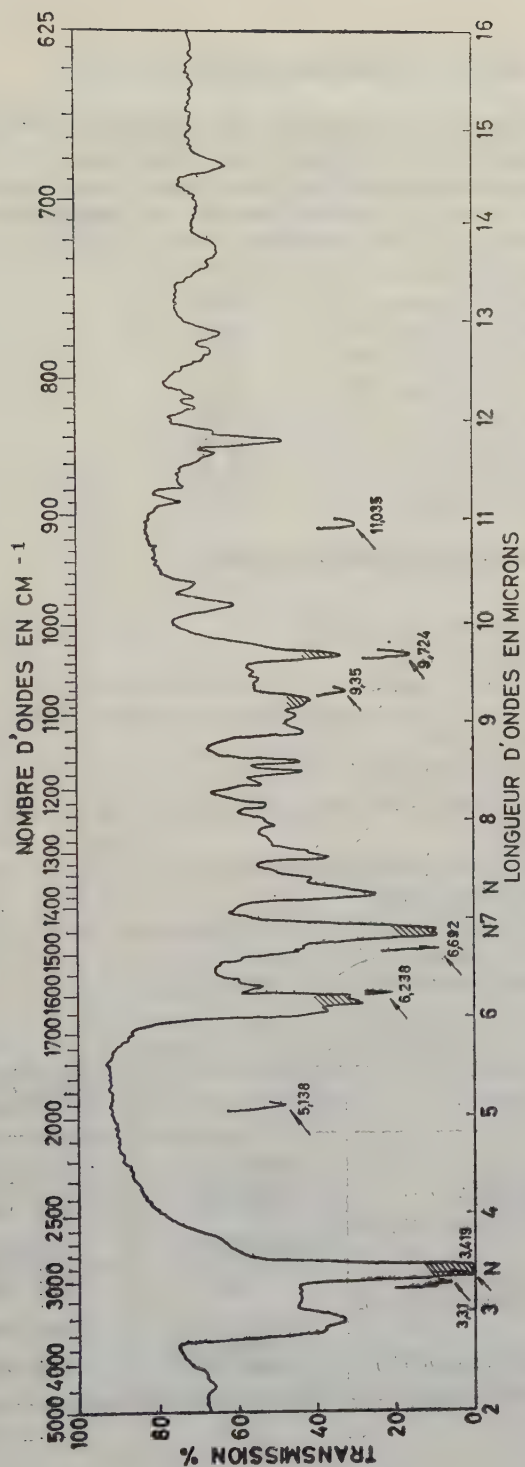


Fig. 12. — Spectre infrarouge du Lespécapitoside en suspension dans le Nujol.

lisoir plein d'eau à la température du laboratoire (18°-20°). On agite fréquemment, on filtre rapidement et on mesure 5 ou 10 ml du filtrat dans un cristalliseur taré, on évapore à sec le solvant au bain-marie, on dessèche le résidu dans le vide phosphorique jusqu'à poids constant. On obtient ainsi le poids de substance dissoute : (en grammes pour 100 ml de solvant à 20°) :

Alcool méthylique	0,75
Alcool éthylique à 95°	0,62
Alcool éthylique à 60°	0,14
Alcool éthylique à 30°	0,07
Eau à 20°	0,05
Eau bouillante	0,13
Acétone	0,033
Acétate d'éthyle	0,012

Etude en chromatographie sur papier

Technique

Chromatographie ascendante :

Papier : Arches 301.

Durée : 15 à 17 heures.

Taches de 10 μ l d'une solution saturée dans l'alcool méthylique ou l'alcool à 60°.

Température : 20 °C $\pm$ 1°.

Trois solvants ont été utilisés, on n'obtient qu'une seule tache aux Rf suivants :

— Butanol acétique (Mélange de Partridge)	0,48
— Acide acétique 15%	0,46
— Mélange alcool isoamylique - hexane - acide acétique - eau : 3, 1, 3, 3 ; V/V.	0,30-0,35

(Rf calculé pour l'extrémité de la tache).

Révéléteurs et coloration obtenue

Révéléteurs	Lumière naturelle	Lumière ultra-violette
0		
Vapeurs ammoniacales.	jaune pâle	brun rosé
Potasse alcoolique (5%).	jaune vif	jaune vert brillant
Trichlorure d'aluminium (2% alcool 96°).	jaune vif	jaune orangé
	jaune serin	jaune vif
Chlorure ferrique (2%, alcool 96°).	vert	très brillant
Carbonate de sodium (2% sol. aqueuse)	jaune serin vif	brun foncé
	puis beige rosé	jaune orangé
Acétate d'urane (2% alcool 60°)	beige rosé	brun foncé

Analyse élémentaire

Elle a été effectuée sur le produit recristallisé dans l'alcool à 40° et séché sous 20 mm de mercure à 138°, à poids constant.

Les résultats ont été les suivants :

Déterminations :

C %	H %	O % (par différence)
53,16	4,82	42,12
53,33	4,71	41,96

Calculé pour $C_{21}H_{20}O_{11}$, H_2O (1)
 PM = 466
 C % = 54,07 ; H % = 4,72

D'après ces résultats, le point de fusion et l'examen des spectres U.V. et I.R., il semble qu'il s'agisse d'une substance nouvelle vraisemblablement un hétéroside, pour laquelle nous proposons le nom de lespécapitoside.

II. — PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

Réactions colorées

Une solution alcoolique à 1‰ a été préparée.

1) *Action de l'acide chlorhydrique et du magnésium* (réaction dite de la cyanidine). La coloration obtenue varie du rouge orangé à l'orangé selon la concentration en lespécapitoside.

Si l'on remplace le magnésium, par le zinc, la coloration est rose lilas soutenu.

2) *Coloration en milieu alcalin.*

Le lespécapitoside se dissout dans les liqueurs alcalines (NaOH, KOH) en donnant une solution jaune intense.

3) *Coloration avec le chlorure ferrique.*

La solution alcoolique de lespécapitoside prend par addition d'une solution diluée de chlorure ferrique une coloration verte devenant rapidement brun vert avec floculation.

4) *L'acétate basique de plomb* produit sur une solution alcoolique de lespécapitoside une coloration jaune d'or intense et une précipitation.

5) *L'acétate de magnésium en solution alcoolique à 5%* intensifie la coloration jaune initiale sans provoquer de fluorescence.

6) *La réaction citro-borique de WILSON [40]* donne une coloration vert jaune et une fluorescence marquée en lumière ultraviolette.

(1) Le produit cristallisé dans l'alcool à 40° correspond donc avant séchage dans le vide à poids constant à $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot 2OH_2$.

7) *Le trichlorure d'aluminium en solution alcoolique* donne, avec une solution de lespécapitoside, une coloration jaune verdâtre.

8) *L'acide sulfurique concentré* dissout le lespécapitoside en donnant une solution jaune présentant une fluorescence jaune très intense en lumière ultraviolette.

9) *Le molybdate d'ammonium en solution aqueuse* à 10% augmente la coloration jaune initiale de la solution alcoolique.

En résumé, les colorations obtenues apparentent plutôt le lespécapitoside aux flavones vraies.

Essais d'hydrolyse

De nombreux essais d'hydrolyse ont été effectués sur le lespécapitoside purifié, par des méthodes différentes.

1) HYDROLYSE ACIDE EN MILIEUX AQUEUX.

Selon la méthode décrite par HASEGAWA, 0,50 g de produit a été traité par 80 ml d'acide sulfurique à 2% en volume.

a) *Hydrolyse courte.*

Le temps de contact a été de 2 heures au bain-marie bouillant à reflux ; on n'obtient pas de dissolution complète au sein de la liqueur qui brunit ; un résidu noirâtre recueilli représente environ le dixième du produit de départ ; sur ce résidu dissous dans l'alcool éthylique nous avons effectué une chromatographie sur papier :

Papier : Arches 301 ; *solvant* : mélange alcool isoamylique, hexane, acide acétique, eau (3-1-3-3) ; *durée* : 15 heures ; *température* : $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$; *taches* de 10 μ l.

En plus d'une tache de Rf 0,40 - 0,50, donc légèrement plus élevé que celui de la substance initiale de départ, on observe des trainées ; l'une brun rougeâtre après carbonate de sodium, de l'origine jusqu'à Rf 0,40, l'autre jaune pâle, de Rf 0,60 à 0,85 présentant une coloration plus marquée et une fluorescence jaune assez intense aux environs de Rf 0,85.

La liqueur aqueuse résiduelle est épuisée par l'éther sulfurique qui se colore en brun jaune. Sur le résidu d'évaporation de ce solvant une nouvelle chromatographie est effectuée qui donne les mêmes résultats.

b) *Hydrolyse longue.*

Le temps de contact a été de 5 heures au bain-marie bouillant à reflux ; un résidu noirâtre a été obtenu comme précédemment. Les liqueurs aqueuses ont été épuisées par l'éther. Pour le résidu d'évaporation de ce solvant, les résultats en chromatographie ont été similaires aux précédents : en plus de la tache correspon-

dant au lespécapitoside on a une tache de Rf plus élevé 0,90-0,95 de fluorescence jaune vif en lumière ultra violette.

D'autres essais ont été effectués en augmentant la concentration en acide. Les résultats furent similaires.

2) HYDROLYSE SULFURIQUE EN PRÉSENCE D'ÉTHYLÈNE-GLYCOL [9 bis].

On ajoute successivement à 1 partie de lespécapitoside, 5 parties d'acide sulfurique concentré, 45 parties d'eau et 50 parties d'éthylène-glycol. On laisse 8 heures au bain-marie bouillant ; la dissolution s'effectue progressivement et complètement. Il se produit ensuite un nouveau précipité très ténu. L'hydrolysate est ensuite abandonné à la température du laboratoire. Au bout de 24 heures, il y est ajouté une quantité d'eau telle qu'il se produise un trouble persistant, le tout est mis au réfrigérateur ; quarante-huit heures après, il s'est formé un précipité très léger qui est recueilli par centrifugation, puis placé sous vide phosphorique ce qui n'empêche pas sa résinification (R).

L'hydrolysate filtré est remis au réfrigérateur puis épuisé par l'éther sulfurique qui se colore en jaune ; l'extrait étheré concentré donne un dépôt jaune (E), examiné en chromatographie ; d'autre part les liqueurs étherées sont évaporées à sec et le résidu (A) est repris par l'alcool méthylique.

La chromatographie est effectuée dans le mélange de Partidge (Papier Arches 301 ; durée 15 heures ; température $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$; révélateur carbonate de sodium), l'extrait étheré E montre une trainée importante jaune de Rf 0 à 0,70 et une tache jaune vert assez fluorescente de Rf 0,75 à 0,88. Pour A les résultats sont similaires mais les taches beaucoup moins intenses ; quant au produit R, il est insoluble dans l'éther sulfurique, même à chaud, insoluble dans le chloroforme, soluble dans l'alcool méthylique. Examiné en chromatographie sur papier dans les mêmes conditions que précédemment, ce précipité fournit une trainée depuis le départ jusqu'à Rf 0,50. Il en est de même des eaux-mères aqueuses d'hydrolyse.

Toutes ces substances donnent une réaction de la cyanidine plus ou moins orangée analogue à celle du produit initial.

3) MICRO-HYDROLYSE EN MILIEU ACÉTONE CHLORHYDRIQUE [73].

5 mg de substance sont ajoutés à 0,5 ml d'acétone renfermant 1% d'acide chlorhydrique concentré et le flacon soigneusement bouché est abandonné 20 jours à 20° . On ajoute alors 1 ml d'eau distillée puis 0,5 ml de chloroforme (1) ; après agitation on sépare

(1) L'éther donne les mêmes résultats que le chloroforme.

le chloroforme, on répète l'épuisement 2 fois avec du chloroforme neuf et les extraits chloroformiques sont évaporés. Le résidu obtenu est examiné en chromatographie sur papier : on n'observe pas de trainées comme précédemment. En plus d'une tache de Rf 0,40-0,48, correspondant au lespécapitoside, on voit une tache très jaune dans le visible et en lumière ultra-violette, avant pulvérisation de potasse, de Rf 0,80 à 0,95 dans le mélange de Partridge.

Les résultats semblant satisfaisants, un second essai a été tenté par cette méthode, en prolongeant la durée d'hydrolyse pendant trois mois. Au bout de cette période le résidu est recueilli, séché sous vide phosphorique et pesé, il représente le tiers de la quantité de départ. Ce résidu qui présente une réaction de la cyanidine orangée, dissous dans l'alcool méthylique, donne dans les conditions précédentes de chromatographie, la tache correspondant au lespécapitoside et l'extrait chloroformique une tache de Rf 0,80-0,90. Les résultats sont donc tout à fait similaires aux précédents.

Le spectre ultra violet de la substance provenant de l'extraction étherée ou chloroformique et donnant une tache de Rf 0,80 - 0,90 a été déterminé : on observe une décroissance continue de l'absorption depuis $225m\mu$, d'abord rapide jusqu'à $275m\mu$ puis lente jusqu'à $375 m\mu$: il ne peut donc s'agir d'une génine flavonique.

La recherche des sucres a été faite sur la liqueur d'hydrolyse. Après neutralisation par le carbonate de baryum et filtration, la solution a été concentrée au bain-marie jusqu'à réduction convenable. (concentration qui correspondrait à 2% de sucres, calculée pour une hydrolyse totale donnant une molécule de glucose pour une molécule de génine).

La chromatographie descendante continue a été effectuée dans le mélange butanol-pyridine-eau : 6-4-3, pendant 24 heures, avec des témoins de glucose, rhamnose, galactose, xylose, arabinose à 2% (5μ l). Après séchage du chromatogramme, on révèle au phosphate d'aniline (aniline redistillée 0,4 ml, thymol 2 g, acide ortho-phosphorique 2 ml, alcool à 96° q.s.p. 150 ml.) et on porte 15 minutes à 105°.

On n'observe aucune tache nette pour les liqueurs d'hydrolyse.

En conclusion, tous les essais d'hydrolyse se sont montrés négatifs ; on peut seulement remarquer que la molécule s'est toujours trouvée partiellement dégradée puisqu'il est apparu une tache d'un Rf presque double de celui de la substance initiale ; peut-être s'est-il produit une isomérisation, aboutissant à un produit de transformation.

Le lespécapitoside se comporte donc à l'hydrolyse comme d'autres flavonoïdes difficilement dédoublables : cytiside [124, 129 bis], vitexine [49], orientine [82], vernaloside [124 bis], aphloïo-

side [129 bis], scoparine [129 bis, 162] alliaroside [127], qui ont souvent des spectres de même allure.

Groupement méthoxylé

La recherche par la méthode de VIEBOCK et BRECHER, d'un groupement méthoxylé a été négative pour le lespécapitoside.

Dérivé méthylé

0,30 g de lespécapitoside sont introduits dans un ballon à col rodé muni d'un réfrigérant à reflux, on ajoute 60 ml d'acétone anhydre, 2 g de carbonate de potassium anhydre et 0,5 ml de sulfate de méthyle.

Après 8 heures au bain-marie bouillant on ajoute après refroidissement les mêmes quantités d'acétone, de carbonate de potassium et de sulfate de méthyle et on laisse 60 heures au bain-marie bouillant. On filtre à chaud sur papier, le résidu est épuisé deux ou trois fois par l'acétone à chaud. On réunit le filtrat et les liqueurs de lavage, on les évapore à sec dans un cristalliseur. Le résidu est épuisé plusieurs fois à chaud par le chloroforme, qui est ensuite lavé rapidement par la soude à 1 %, et séché sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporé à sec à la température du laboratoire.

Le produit obtenu est blanc crème, son point de fusion est de 115° (blanc de Köfler), il a été soumis à la chromatographie sur papier, méthode ascendante, dans le mélange de Partridge pendant 15 heures, sur papier Arches 302 ; le chlorure ferrique ne révèle aucune tache dans le visible, en lumière ultraviolette on distingue plusieurs taches d'une fluorescence bleue intense, Rf 0,30, 0,42, 0,58, 0,78, 0,95 ; les trois dernières particulièrement intenses.

Après révélation au chlorure ferrique, seules les trois dernières taches présentent en lumière ultra violette une fluorescence verte.

Par des recristallisations successives dans le benzène, on obtient un produit blanc, présentant une fluorescence bleue intense en lumière ultraviolette.

La détermination des groupements méthoxylés par la méthode de VIEBOCK et BRECHER met en évidence 4 groupements OCH_3 :

Trouvé	21,54 % OCH_3 .
Calculé pour 3 OCH_3	18,30 %
Calculé pour 4 OCH_3	23,75 %

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet déterminé au moyen du spectrophotomètre Unicam S.P. 500 sur une solution à 1/50 000 dans l'éthanol montre deux maximums : le premier à 265 m μ sensiblement comme le lespécapitoside, le deuxième à 330 m μ (décalé de 20 m μ vers la gauche par rapport au lespécapitoside).

Groupement hydroxylé : indice d'acétyle

La détermination de l'indice d'acétyle a été faite par la méthode de DELABY et SABETAY [45].

0,20 g de lespécapitoside sont traités par 2 ml de réactif acétylant (2 parties de pyridine anhydre — 1 partie d'anhydride acétique). On porte 2 heures au bain-marie bouillant dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et on titre l'excès d'acide acétique avec de la potasse alcoolique N/2, en présence de phénolphthaleïne, par rapport à un témoin contenant 2 ml de réactif acétylant seul. L'indice d'acétyle, ou nombre de milligrammes d'acide acétique fixés par gramme de substance, est de 960, pour le lespécapitoside cristallisé, ce qui correspond à une teneur en hydroxyle acétylable de 27,20%.

Calculé pour la formule : $C_{21}H_{30}O_{11}$, $OH_2=466$

— pour 7 OH : OH% 25,5 %

— pour 8 OH : OH% 29 %

On met donc en évidence par cette méthode plus de 7 hydroxyles acétylables dans la molécule de lespécapitoside.

Dérivé acétylé

Préparation : 0,20 g de lespécapitoside sont dissous dans 5 ml d'anhydride acétique et on ajoute 2 à 3 gouttes d'acide sulfurique concentré, il se développe une coloration jaune ; la fiole conique est laissée pendant quatre jours à la température du laboratoire, le mélange est ensuite versé goutte à goutte, en agitant constamment, dans 50 ml d'eau glacée, la fiole est alors portée au réfrigérateur pendant 24 heures. Le précipité blanc qui s'est formé est recueilli sur un entonnoir en verre fritté, lavé plusieurs fois à l'eau glacée et desséché dans le vide sur anhydride phosphorique. Il est alors recristallisé dans l'alcool méthylique. Le point de fusion de cette substance, déterminé au bloc Maquenne, est de 160-162°.

Le dérivé obtenu ne donne plus de coloration par le chlorure ferrique.

Saponification du dérivé acétylé :

0,25 g environ du dérivé acétylé obtenu précédemment ont été mis en suspension dans 3 ml d'alcool éthylique à 95° et additionnés de 3 ml de potasse alcoolique à 30%. On chauffe à reflux 1 heure au bain-marie bouillant.

Après refroidissement on ajoute 20 ml d'acide orthophosphorique à 10% et on distille avec précaution à feu nu dans un appareil entièrement en verre ; lorsque l'on a recueilli 20 ml de distillat on ajoute à nouveau dans le ballon 20 ml d'acide orthophosphorique et on arrête la distillation quand 30 ml de distillat sont obtenus en tout.

L'acide acétique du distillat est ensuite titré par la potasse alcoolique N/10 en présence de phénolphthaléine.

Résultats (poids moléculaire du lespécapitoside admis précédemment : 466, d'où poids moléculaire du dérivé hexaacétylé : 718).

— 1^{re} détermination (0,25 g) :

Potasse utilisée : 20,7 ml soit $(0,0043 \times 20,7) : 0,089$ g de COCH_3
Calculé pour 6 groupements acétylés :

$$\frac{258 \times 0,25}{718} = 0,089$$

— 2^e détermination (0,20 g)

Potasse utilisée : 16,89 ml soit $(0,0043 \times 16,89) : 0,072$ g de COCH_3
Calculé pour 6 groupements acétylés :

$$\frac{258 \times 0,20}{718} = 0,0718$$

Il semble donc qu'il y ait 6 oxhydriles acétylables par cette méthode dans la molécule de lespécapitoside.

Fusion alcaline

Dans un creuset en acier inoxydable, à 5 g de potasse caustique en pastilles et 2,5 ml d'eau on ajoute 0,10 g de lespécapitoside ; il s'y dissout rapidement en donnant une solution jaune foncé.

On chauffe alors une première fois 5 minutes à 240°, la coloration passe au jaune orangé puis au rouge ; après 6 minutes à 280°, la solution redevient jaune.

Sur le résidu refroidi on ajoute 50 ml d'eau et on acidifie la solution par de l'acide sulfurique au demi (25 ml). On épuise alors la liqueur par de l'éther sulfurique dans une ampoule à décantation, à plusieurs reprises ; les liqueurs étherées réunies sont épuisées à plusieurs reprises par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium qui dissout les acides-phénols formés, en laissant la fraction phénolique (A) ; la fraction acide-phénol (B) est obtenue par acidification des solutions bicarbonatées et extraction étherée. On obtient finalement deux fractions étherées A et B renfermant les dérivés phénoliques et les dérivés acides. Après déshydratation sur sulfate de sodium anhydre, ces deux fractions sont soumises à la chromatographie sur chromatoplaques de gel de silice (0,5 mm d'épaisseur) par la méthode ascendante, pendant 35 minutes en présence de témoins (1), en solution à 1%.

(1) Phloroglucinol, Résorcinol, Acétovanillone, Ac. vanillique, Ac. protocatéchique, Ac. parahydroxybenzoïque.

Le développement est effectué par un mélange : toluène, acétate d'éthyle, méthanol (6/8/1 v/v) et la révélation par la p-nitraniline diazotée (1) [24].

Dans la fraction phénolique (A) a été caractérisé le phloroglucinol, Rf 0,50 et dans la fraction acide (B) l'acide protocatéchique, Rf 0,60.

On a donc une dégradation analogue à celle observée par STAMBOULI et PARIS [162] pour le scoparol (fig. 13).

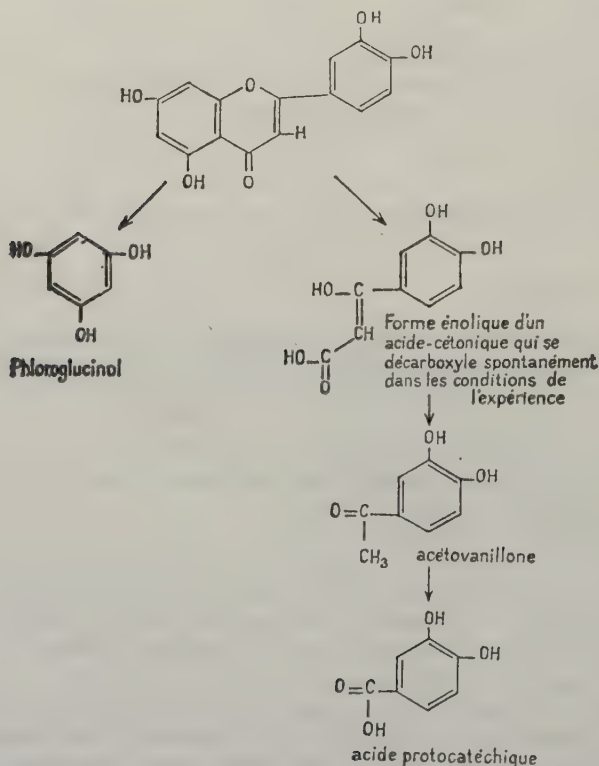


Fig. 13. — Schéma de la dégradation alcaline.

(1) a) solution 1 : p-nitraniline 0,3 % dans 8 % (p/v) HCl (25 ml) ; solution 2 : NaNO₂ (5 % p/v) (1,5 ml).

Mélanger au moment de l'emploi, pulvériser et après séchage, pulvériser la solution ; b) Na₂CO₃ (20 % p/v).

CHAPITRE VII

AUTRES FLAVONOÏDES
DU *LESPEDEZA CAPITATA* Michx.

1) La chromatographie sur papier de la teinture de tiges feuillées du *Lespedeza capitata* et des précipités bruts obtenus dans l'acétate d'éthyle, révèle la présence de deux flavonoïdes de Rf 0,30 et 0,55 dans le butanol acétique, en dehors du lespécapitoside (de Rf 0,48).

Nous avons cherché à les isoler des eaux mères de cristallisation de ce dernier, mais la concentration n'a donné aucun produit pur : il reste toujours une petite quantité de lespécapitoside dans les substances qui se séparent ; en outre, les tanins sont en proportion importante et empêchent toute cristallisation, c'est pourquoi il a été procédé à une hydrolyse acide, dans le but de mettre en liberté les génines flavoniques, plus faciles à caractériser que les hétérosides.

Cinquante ml d'eaux mères ont été additionnés de vingt ml d'eau distillée et le tout ramené au volume initial pour chasser l'alcool.

Lors du refroidissement de la liqueur, il se forme un précipité brun constitué surtout par des tanins, donnant faiblement la réaction de la cyanidine et qui a été éliminé par filtration. Le filtrat a été additionné de 3 ml d'acide sulfurique concentré et chauffé au bain-marie bouillant pendant 5 heures. Dès les premières minutes, il se produit un dépôt rouge (rouge catéchique) éliminé par filtration.

Le précipité jaune brun final, formé après cinq heures, a été recueilli sur filtre de verre fritté, séché, puis traité par de l'éther à l'ébullition. D'autre part, les eaux mères ont été épuisées par de l'éther dans une ampoule à décantation. Les solutions éthérées ont été évaporées, reprises par un faible volume d'alcool et soumises à la chromatographie sur papier dans le butanol acétique dans les conditions précédemment décrites. On obtient deux taches très distinctes de Rf 0,80 et 0,90, jaunes en lumière ultraviolette et dans le visible. La liqueur épuisée par l'éther donne encore la tache correspondant au lespécapitoside, peu touché par l'hydrolyse, mais seulement très faiblement celles correspondant aux autres flavonoïdes.

Des essais de fractionnement de la solution éthérée concentrée ont été effectués sur colonne de silice, l'élution a été faite par de l'éther de pétrole enrichi progressivement en acétate d'éthyle ; l'éther de pétrole renfermant 25% d'acétate d'éthyle élue une substance présentant une fluorescence bleue intense en lumière

ultra-violettes (Rf 0,90). Les génines flavoniques sont éluées totalement par l'éther de pétrole renfermant 30% d'acétate d'éthyle. Il ne nous a pas été possible d'approfondir encore cette étude.

II) D'autre part, nous avons étudié l'extrait éthéré provenant du dégraissage de la plante lors de l'extraction par les solvants successifs. Cet extrait ne donne pas la réaction de la cyanidine, cependant, examiné en chromatographie sur papier, il donne une tache principale de fluorescence jaune-vert (Rf 0,85) (voir p. 69). pouvant être attribuée à un dérivé flavonique.

L'extrait sec a donc été repris à chaud par le minimum d'alcool éthylique à 50° ; la solution est filtrée à chaud sur papier qui retient un volumineux résidu de graisses et de chlorophylle. Le filtrat, limpide, brun rouge, donne une réaction de la cyanidine d'un rouge intense.

Le flacon est alors abandonné à la température du laboratoire pendant vingt-quatre heures puis porté au réfrigérateur. Au bout d'un temps variable (une à trois semaines) il apparaît au fond et sur les parois du flacon, un dépôt cristallisé jaune, mais le rendement est infime.

Ce précipité jaune est formé de fines aiguilles jaunes, feutrées, enchevêtrées (F. inst. 282°) que nous appellerons substance P.

Cette substance en solution alcoolique à 1% a été examinée en chromatographie sur papier dans le butanol acétique selon la technique précédemment décrite.

En lumière ultra-violettes, on distingue 2 taches de Rf nettement distincts de celui du lespécapitoside (0,48), l'une plus importante jaune (Rf 0,82), l'autre brun rosé (Rf 0,90) ; après révélation par la potasse alcoolique, elles confluent en une seule tache allongée jaune.

Nous résumons du reste dans le tableau suivant les colorations que nous avons obtenues pour la tache principale après révélation.

Révéléateur	Coloration obtenue
— lumière naturelle	jaune
— lumière ultra-violettes	fluorescence jaune vert
— lumière ultra-violettes + vapeurs ammoniacales	jaune
KOH	jaune vert
AlCl ₃	jaune
Na ₂ CO ₃	fluorescence jaune intense
SbCl ₃	jaune

Par ailleurs, la solution alcoolique à 1% de la substance P donne un précipité rouge orangé intense avec l'acétate basique de plomb (dans les mêmes conditions le lespécapitoside donne un précipité jaune vif). Il s'agit donc d'un flavonol, qui d'après son point de fusion semble proche du kaempférol ou trihydroxy-5-7-4'-flavonol.

Cependant un témoin de ce dernier donne une tache jaune en lumière ultra violette et après potasse, de Rf 0,90, donc un peu plus élevé que celui de la tache principale du produit P.

Le spectre ultra-violet a été déterminé au moyen du spectrophotomètre UNICAM S.P. 500 sur une solution à 1/50 000 dans l'alcool.

L'absorption débute à 225 m μ , il y a un premier maximum à 260 m μ , un deuxième à 365 m μ et la courbe décroît ensuite régulièrement ; le minimum se situe à 280 m μ . Ce spectre est donc très voisin de celui du kaempférol (maximums 265 m μ et 365 m μ , minimum à 280 m μ).

En résumé, le *Lespedeza capitata* renferme d'autres flavonoïdes que le lespécapitoside. Il ne nous a pas été possible de les séparer à l'état cristallisé, à l'exception d'une petite quantité d'un flavonol, de propriétés voisines de celles du kaempférol.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

CHAPITRE PREMIER

EMPLOI DES *LESPEDeza* EN MEDECINE POPULAIRE ET TRAVAUX ANTERIEURS

Nous n'avons trouvé que quelques références éparses concernant les emplois des *Lespedeza* en thérapeutique.

En 1874, SOUBEIRAN et DABRY de THIERSANT [161] indiquent que la racine de « *Lespedeza* » est employée en Chine comme « alexipharmaque », anthelminitique et vulnérable. Peu après, le Dr MÈNE [99] rapporte que les médecins japonais et chinois prescrivent les racines de *Lespedeza* comme remède apéritif, amer et tonique dans les affections de l'estomac ; ils leurs attribuent également des propriétés anthelmintiques.

Enfin PERROT et HURRIER [133] précisent que la racine de l'espèce *Lespedeza chinensis* G. Don., possède des propriétés sédatives et anthelmintiques.

Quant au *Lespedeza capitata* Michx, on relève dans le catalogue d'une droguerie américaine spécialisée dans la préparation de teintures homéopathiques, que son emploi dans le Mal de Bright remonte au début du XIX^e siècle où il était utilisé avec succès par des phytothérapeutes dont le chef de file était Samuel THOMSON, de Boston.

En 1953, HALPERN et TROLLET [65] ont étudié l'action de l'extrait de *Lespedeza capitata* dans les néphrites allergiques expérimentales chez le Lapin. Une néphrite urémigène chronique est provoquée chez les animaux par injection intra-veineuse d'un sérum néphrotoxique obtenu chez le Canard. Les Lapins présentent rapidement le syndrome urinaire et sanguin de l'azotémie : albuminurie, urée sanguine entre 1,10 et 2,50 g, tension artérielle de 3 à 6 cm de Hg au-dessus de la normale.

Chez les animaux recevant tous les jours par sonde gastrique 1 ml par kg de teinture fraîche de *Lеспедеза capitata* les auteurs constatèrent, chez quatre sur cinq des animaux traités, une baisse constante et notable de la teneur de l'urée sanguine.

Cette action favorable ne se prolonge cependant pas au-delà de la durée du traitement. Elle est reproductible, mais la drogue est inopérante au stade terminal des néphrites subaiguës.

Enfin des travaux en cours (1) ont trait à l'action de préparations de *Lеспедеза capitata* sur l'athérome du Lapin.

L'emploi d'une teinture de *Lеспедеза capitata*, des flavonoïdes totaux et du lespécapitoside chez des Lapins soumis à un régime athérogène retarde l'élévation de la teneur des lipides totaux, du cholestérol total et estérifié, du phosphore lipidique et des acides gras estérifiés pendant les premiers mois du traitement. Après quatre mois il semble que la teneur des divers lipides sanguins tende à s'égaliser chez les animaux traités et les animaux témoins mais, seul de ces diverses substances, le lespécapitoside semble agir sur l'infiltration lipidique de la paroi aortique.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

ESSAIS DE TOXICITÉ

1. Toxicité aiguë

A - Alcoolature de *Lеспедеза capitata*, la préparation effectuée avec des sommités selon la méthode décrite p. 59 et correspondant au 1/5 de son poids de plante sèche a été essayée sur la Souris et sur le Rat.

a) *Souris blanche*, lignée Swiss, mâles et femelles de 20 g, 4 lots de 10 animaux. La teinture a été concentrée au 1/5 sous pression réduite, le résidu a été dilué avec de l'eau distillée chaude de façon à ajuster au volume initial. Injectée par voie sous-cutanée à la dose de 1 ml par animal (correspondant à 0,20 g de plante sèche, soit 10 g/kg), cette solution n'a provoqué la mort d'aucun animal pendant 7 jours d'observation.

b) *Rat*, lignée Wistar, mâles et femelles de 180 g, 4 lots de 10 animaux.

Par injection dans les mêmes conditions que précédemment à la dose de 10 ml par animal soit 11 g/kg, on n'a observé aucune mort pendant 7 jours.

(1) Expérimentation faite par le Dr L. SCÉBAT, Service du Professeur LÉNEGRE (Hôpital Boucicaut).

Le *Lespedeza capitata* est donc très peu toxique dans les conditions de l'expérience.

B - *Lespécapitoside*

Selon la technique précédente une suspension de 1 g de substance dans 200 ml d'eau a été essayée par la voie sous-cutanée à la dose de 1 ml chez la Souris de 20 g (soit 0,25 g/kg) et de 10 ml chez le Rat de 180 g (0,28 g/kg) ; aucune mort n'est survenue au cours des 7 jours d'observation.

Il en a été de même en opérant par la voie orale et aux mêmes doses.

2. Toxicité chronique

A. SOURIS

a) Essai A (*Alcoolature de Lespedeza capitata*)

La préparation précédente a été diluée au 1/4.

Un lot de 20 Souris blanches de race Swiss, d'un poids initial de 15 g, nourries de gâteaux « Causse », a reçu à volonté comme boisson cette préparation correspondant au 1/20 de son poids de plante sèche, un lot témoin recevant uniquement de l'eau distillée.

Résultats

Liquide ingéré par jour : Lot témoin : 3,3 ml pour 5 Souris.
Lot traité : 3,1 ml pour 5 Souris soit 0,03 g de drogue par Souris.

b) Essai B (*Lespécapitoside*).

Le lespécapitoside en solution au 1/4000 dans l'eau distillée a été donné dans les mêmes conditions, la quantité ingérée est de 3,3 ml par jour pour 5 Souris soit 0,00016 g par Souris.

Dans les deux cas l'expérience a été poursuivie pendant 60 jours : en fin d'expérience ont été notés :

— les variations de poids, qui est passé de 15 à 25 g pour tous les animaux,

— l'aspect extérieur des animaux, qui est normal ;

— l'aspect macroscopique des organes après autopsie qui n'a révélé aucune différence entre les témoins et les animaux traités.

B. RAT

Des lots de 10 Rats, Wistar, mâles et femelles de 250 g, ont été traités comme précédemment, les doses ingérées par jour et pour 5 Rats ont été :

a) Essai A : 9,1 ml soit 0,09 g de drogue par animal.

b) Essai B : 9,5 ml soit 0,00047 g de lespécapitoside par animal.

Le poids des animaux a crû régulièrement pendant les 60 jours d'observation.

Témoin	: 41 g
Essai A	: 39 g
Essai B	: 40 g

Le poil des animaux de l'essai A est devenu légèrement jaunâtre ; l'observation des organes de tous les animaux n'a fait apparaître aucune lésion à l'autopsie.

Le lespécapitoside et le *Lespedeza capitata* n'ont donc montré aucune toxicité dans les conditions de l'expérience.

Action du lespécapitoside sur la pression artérielle chez le Rat

Nous avons utilisé pour cette détermination l'oscillomètre enregistreur pour petits animaux de GIONO, CHEVILLARD et KRAUTHAMER. Ces auteurs ont mis au point au cours de recherches antérieures [32, 60, 86] un oscillomètre très sensible à amplification électronique qui permet l'enregistrement des pulsations chez les petits animaux.

Description de l'appareil (fig. 14).

L'appareil comprend : 1) un manchon en matière plastique avec poche en latex très souple, s'adaptant parfaitement soit à la queue (Rat, Souris), soit à la patte (Lapin, Cobaye), soit au doigt de l'Homme. 2) une capsule différentielle dont la membrane agit sur un circuit électrique convertissant les variations de pression en variations de courant. 3) un amplificateur électronique. 4) une table enregistreuse munie d'un moteur synchrone. 5) un oscillographe à plume pour l'inscription des pulsations. 6) une capsule oscillographique inscrivant la courbe de la contre-pression exercée sur l'organe à l'aide du manchon. 7) un manomètre à colonne de mercure. 8) un vase de détente de l'air comprimé.

Mesure.

Pour la mesure, le manchon est glissé à la base de la queue puis maintenu en place avec une bande de sparadrap, le manchon est cylindrique et formé de deux feuillets de latex très souples, le feuillet extérieur est recouvert par une toile inextensible. Le diamètre intérieur du manchon dépend de la grosseur du Rat et la longueur est de 15 mm.

L'animal est mis en contention dans une boîte assez vaste, à 2 compartiments, pouvant contenir plusieurs animaux, cette boîte est chauffée électriquement par 1 ou 2 lampes tubes, car, à la température du laboratoire, la queue du Rat est en général en vaso-constriction, la pression est à ce niveau inférieure à la

pression centrale et les oscillations sont très faibles. C'est pourquoi nous devons réchauffer l'animal pour obtenir une vasodilatation de la queue en évitant cependant des températures trop élevées. De bons résultats sont obtenus en plaçant les Rats à la température de 30°. Après 15 minutes, l'animal est en général assez calme pour que l'on puisse effectuer les mesures.

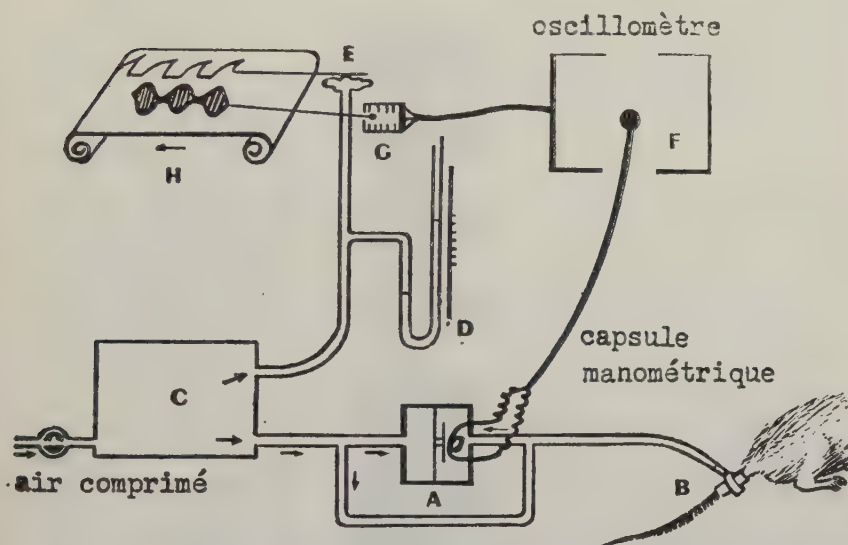


Fig. 14. — Schéma de l'oscillomètre enregistreur pour petits animaux de GIONO, CHEVILLARD et KRAUTHAMER.

- A. Capsule manométrique différentielle à amplification électronique ; B. Manchon appliqué à la queue de l'animal ; C. Vase de détente de l'air comprimé ; D. Manomètre à mercure de référence ; E. Capsule manométrique inscrite de la contre-pression ; F. Oscillomètre enregistreur ; G. Oscillographe magnétique à encre ; H. Table à déroulement continu.

On relie alors le manchon par un tube de polyéthylène au circuit de l'appareil de mesure. La compression pneumatique de la queue est faite à vitesse constante (environ 1 cm de mercure par seconde), en enregistrant simultanément la courbe oscillométrique et celle de la compression. Une lecture instantanée de la pression moyenne et de la pression systolique peut être faite au manomètre à mercure, une mesure plus précise étant effectuée ultérieurement sur le graphique au moyen d'un abaque.

Chaque mesure demande environ 15 à 20 secondes et l'animal peut rester branché sur l'appareil plusieurs heures sans souffrir.

La valeur de la pression artérielle est déterminée en prenant

la moyenne de plusieurs lectures et seuls les enregistrements effectués sur l'animal calme sont utilisables.

Conditions d'expérience.

Un lot de 5 Rats mâles de 4 mois, de race Wistar, de 250 g. 0,05 ml d'une solution à 1‰ de lespécapitoside dans l'alcool à 70° est injecté à chaque animal par voie endoveineuse (dose correspondant à 200 $\mu\text{g/kg}$).

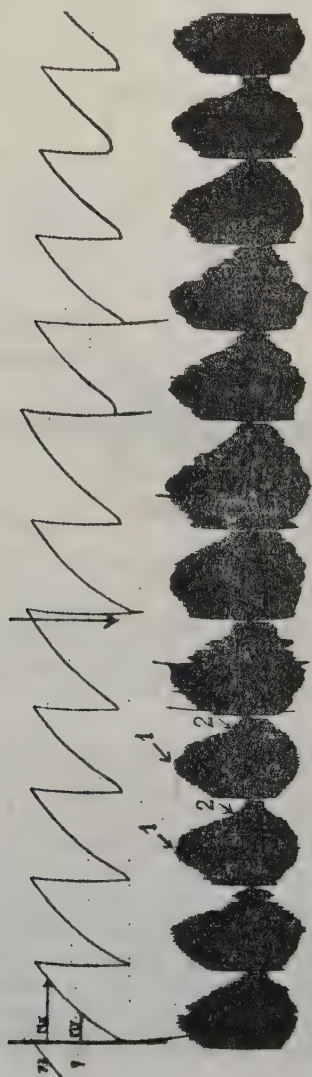


Fig. 15. — Courbes oscillométriques obtenues chez le Rat, avant et après injection intraveineuse de lespécapitoside.

Les flèches indiquent les points de lecture pour l'indice oscillométrique (1) et la pression systolique (2). La partie haute du graphique correspond à l'enregistrement de la contre-pression. Le moment où l'on a fait l'injection intra-veineuse de lespécapitoside est marqué par une flèche verticale ; l'enregistrement graphique a alors été arrêté pendant 1 minute cinquante secondes.

RÉSULTATS (fig. 15).**a) Contre-pression variable de 0 à 16 cm Hg.**

Une minute cinquante secondes après l'injection, on enregistre une élévation passagère de la pression maximale puis une légère diminution progressive sans variation appréciable de la pression minimale.

b) Contre-pression fixe de 8 cm Hg.

(Expérience effectuée après avoir laissé l'animal 24 h au repos). Elle correspond à la pression sub-moyenne, on observe alors 12 secondes après l'injection une diminution de l'amplitude, mais celle-ci est presque équivalente de celle obtenue lorsqu'on injecte la même quantité d'alcool éthylique à 70° (0,05 ml). Le rythme cardiaque ne semble pas modifié.

Action du lespécapitoside sur la perméabilité capillaire du Lapin

Parmi les propriétés physiologiques des dérivés flavoniques, l'action sur les capillaires est l'une des plus importantes et des plus caractéristiques.

Pour sa simplicité d'emploi chez l'animal et la constance des résultats, le test proposé par AMBROSE et DE EDS [5] codifié par PARIS et VAIREL [130] a été adopté : il s'agit de mesurer le temps d'apparition en un endroit irrité par un vésicant, d'une coloration due à la diffusion d'un colorant : le bleu trypan, à travers les capillaires.

La coloration apparaît d'autant moins vite que la perméabilité capillaire est plus faible. Le protocole expérimental est le suivant : le Lapin (animal choisi de préférence) est épilé au sulfure de sodium, au niveau de la région ventrale. On attend quarante-huit heures de façon que la peau ne soit plus irritée, puis il est injecté dans la veine marginale de l'oreille 1 ml par kilogramme d'une solution récente et filtrée de bleu trypan à 1%. Cinq minutes après l'injection du colorant est appliqué un tampon de coton imbibé d'une certaine quantité de chloroforme qui est toujours identique pour une même expérience. Quand on a obtenu le temps normal de diffusion du colorant, le lespécapitoside est injecté par voie intraveineuse en solution dans du propylène-glycol (ce solvant ne modifiant pas, aux doses utilisées, la perméabilité des capillaires) dilué dans de l'eau tiède au moment de l'emploi.

Les Lapins ont reçu des doses de 10 mg/kg de lespécapitoside.

Dans la présente expérimentation, l'apparition du bleu try-

pan à la surface de la peau de l'animal a été notée à deux « niveaux colorés » successifs : au tout début (A), et au moment où la tache bleue était de nuance franche et homogène (B) (l'écart entre les deux mesures donnant une idée de la vitesse de diffusion).

Les mesures ont été faites au temps 0 avant le traitement, puis 10', 30' et 60' après l'injection de lespécapitoside.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Temps d'apparition du bleu trypan en minutes

Lapins	Temps initial		Après 10'		Après 30'		Après 60'	
	A	B	A	B	A	B	A	B
7	4	8	5	15	6	21	9	20
	4	10						
6	8	12	11	17	11	16	6	11
	6	10						
8	7	13	12	18	10	17	7	10
	7	10						
9	4	6	10	20	15	19	11	18
	4	6						
10	3,3	4,15	4	7,30	7	13	7	14
	3	5,30						
Moyenne	5,03	8,28	8,24	15,30	9,48	17,12	8	14,36

A = Début d'apparition.

B = Tache homogène.

CONCLUSIONS

Initialement le délai d'apparition est de 5'03" en moyenne et il faut un peu plus de 3 minutes pour que la tache soit entièrement homogène.

Après injection de lespécapitoside, on voit le délai d'apparition passer à 8'24", puis 9'48" et revenir à 8' au bout de 10', 30' et 60. Le maximum d'action, allongeant le délai de l'ordre de 94% se place donc aux environs de 30'.

Parallèlement le temps nécessaire pour l'homogénéisation des taches passe de 3'25" initialement, à 7'06", à 7'24" et enfin à 6'36" ; ces chiffres confirment que le lespécapitoside, comme de nombreux dérivés flavoniques, diminue effectivement la perméabilité capillaire chez le Lapin.

Action du lespécapitoside sur la résistance capillaire du Cobaye

Pour l'évaluation de la résistance capillaire, parmi les nombreuses techniques préconisées, nous avons recherché la valeur de la dépression nécessaire pour obtenir le début de la rupture des capillaires chez le Cobaye préalablement carencé en vitamine P (régime à base de son, Avoine, eau à volonté, et accessoirement un peu de Betterave).

Le dispositif utilisé comprenait une source de vide stable constituée par un grand flacon relié d'une part à une trompe à vide et à un manomètre sensible, et d'autre part à une petite ventouse de 8 à 10 mm de diamètre dont le bord est bien plan et rodé.

La technique consiste à appliquer sur la peau préalablement rasée de l'animal la petite ventouse dans laquelle on fait un vide partiel avec le dispositif décrit ci-dessus, la dépression provoque l'éclatement des fins capillaires superficiels ce qui se manifeste par de petites taches hémorragiques ou pétéchies.

Pour la mesure de la résistance capillaire, il a été pris comme critère la valeur de la dépression minimum (exprimée en cm Hg) nécessaire pour obtenir le début des éclatements capillaires, c'est-à-dire l'apparition de quelques pétéchies, la dépression étant appliquée pendant une minute exactement.

Sur une série de quinze Cobayes de 350 à 400 g, neuf sont morts avant que leur résistance capillaire soit abaissée de façon significative, l'expérience a donc été poursuivie sur six animaux à résistance capillaire basse.

La résistance capillaire se met à baisser brutalement au bout de 3 semaines de carence, et, de plus de 65 cm Hg au départ, elle tombe à 20-25. A ce moment-là, les animaux reçoivent, par voie intrapéritonéale, une dose de 5 mg de lespécapitoside dissous dans du propylène-glycol. On mesure alors leur résistance capillaire au bout de 30', 1 h 30, 2 h 30, 1, 2, et 3 jours. Le tableau ci-dessous rassemble les résultats obtenus.

Valeur de la résistance capillaire en cm/Hg :

Temps	0	30'	1 h 30	2 h 30	1 jour	2 jours	3 jours
Cobayes N°							
1	30	40	60	60	60	60	60
2	25	60	60	60	60	60	60
3	20	60	60	60	60	60	+
4	20	20	60	60	60	60	60
5	25	30	60	50	50	50	40
6	25	40	60	60	40	40	30
Moyenne	27	41	60	58	55	55	50

On voit que le lespécapitoside a fait remonter la résistance capillaire de façon brutale. Au bout de 1 h 30 à 2 h 30, elle a retrouvé la valeur qu'elle avait au début de la carence.

D'autre part, l'effet est assez prolongé, puisqu'elle est encore de l'ordre de 50 cm Hg au bout de 3 jours après l'administration.

L'état des animaux n'a pas permis d'étendre l'observation au-delà de ce délai.

En conclusion :

Sur des Cobayes carencés en facteur P, à résistance capillaire basse, le lespécapitoside, à la dose de 5 mg/kg par voie intrapéritonéale, a fait remonter la résistance capillaire à une valeur sensiblement normale. Cette action semble assez durable, mais les conditions expérimentales n'ont pas permis d'en définir la durée exacte.

Action du lespécapitoside et de l'alcoolature de *Lespedeza capitata* (1) sur le temps de coagulation sanguine chez le Lapin

Les déterminations ont été faites sur 3 lots homogènes de 10 Lapins mâles, de race « Fauve de Bourgogne », de 4 mois, d'un poids moyen de 2 kg, leur alimentation comprenant : son, Avoine, Betterave et eau à volonté. La coagulation témoin est recherchée sur les 3 lots, un mois, puis 15 jours avant l'expérience.

Pour ce faire : 1 ml de sang est prélevé à la veine marginale de l'oreille et versé dans un tube à hémolyse. On note le temps au bout duquel la coagulation est suffisante pour que le tube puisse être doucement incliné à l'horizontale sans que le coagulum laisse échapper aucune trace de sang. Ce temps sera appelé temps témoin.

Trois jours avant l'expérience, les animaux sont soumis aux traitements suivants

Lot 1 : injection intra-péritonéale de 0,20 g/kg d'alcool éthylique à 70° ;

Lot 2 : 200 µg/kg de lespécapitoside (0,20 ml/kg de solution à 1‰ de lespécapitoside dans l'alcool à 70°).

Lot 3 : 0,20 ml/kg d'alcoolature de *Lespedeza* (correspondant à 0,04 g de plante sèche).

Par jour et pendant 3 jours.

Produit injecté :

	Temps témoin (moyenne)	Temps d'expérience (moyenne)
Alcool à 70°	6'20"	6'10"
Alcoolature de <i>Lespedeza capitata</i>	6'30"	5'
Lespécapitoside	6'10"	6'20"

(1) National Formulary (voir p. 59).

CONCLUSION

Chez les Lapins ayant reçu de l'alcool à 70° ou du lespécapitoside, on ne remarque pas de variation du temps de coagulation.

Par contre, on note une diminution notable du temps de coagulation chez les Lapins auxquels fut injecté l'alcoolature de *Lespedeza capitata*, diminution attribuable sans doute à la proportion assez élevée de tanins existant dans les préparations de *Lespedeza capitata*.

Action du lespécapitoside sur la diurèse chez le Rat

Les propriétés diurétiques des flavonoïdes ont été signalées par plusieurs auteurs dont nous citerons les principaux : FUKUDA [58], NAKAMURA et ses collaborateurs [110, 111, 112], CLERC et PARIS [34, 35], TOUCHAIS [180], CZIMMER [43], UESUGI [181] et BORKHOWSKI [23], l'action du lespécapitocide a donc été essayée.

Des Rats mâles albinos de 200 g environ ont été utilisés. Les animaux, après avoir été alimentés normalement, sont placés dans des cages à métabolisme individuelles en verre, permettant de recueillir l'urine séparée des fèces. Ils y séjournent 24 h sans ali-

Deux types d'essais ont été effectués :

1) Sur des Rats sevrés non seulement de nourriture, mais aussi de boisson, mais à qui une dose fixe de 3 ml de sérum physiologique a été administrée par tubage gastrique matin et soir (soit 6 ml par Rat par 24 h - environ 30 ml par kg).

2) Sur des Rats à jeun mais abreuvés normalement en eau naturelle.

Quel que soit le type d'essai, deux lots parallèles de 5 Rats ont été mis en expérience, les uns non traités (témoins) les autres recevant, en une seule fois, par tubage gastrique au début de l'essai une dose de 10 mg de lespécapitoside par kg d'animal.

RÉSULTATS

Hydratation forcée (diurèse ml/24 h/Rat) :

						Moyenne
Rats témoins :	3,5	1,5	2	3	2,5	2,5
Rats traités :	3	2,5	2,5	3	4,3	3,0
	Variation : +20%					

Hydratation libre (diurèse ml/24 h//Rat)

					Moyenne	
Rats témoins :	6	7	7,2	7,5	8	7,1
Rats traités :	19	7	13	12	11	12,4
			Variation : +74%			

RESULTATS : En hydratation limitée, le lespécapitoside a augmenté légèrement la diurèse du Rat.

En hydratation libre, l'augmentation de la diurèse a été plus nette, cette dernière méthode amenant cependant de plus grandes variations individuelles spontanées chez les animaux en expérience.

Action du lespécapitoside sur la cholérèse chez le Rat

L'action des dérivés flavoniques sur la cholérèse semble variable.

R. PARIS et Mlle J. GUÉGUEN [128] n'ont pas noté d'augmentation de la cholérèse sous l'influence de l'apioside. D'après TOUCHAIS [180] les résultats sont inconstants avec l'aphloïol.

Par contre, M. BRUNAUD et S. BRUNAUD [26] ont mis en évidence une action cholérétique marquée de la triméthoxy-4-3'-4' chalcone, et HENNE [75], celle de la rutine.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'action du lespécapitoside sur la cholérèse.

Sept Rats mâles albinos, de 250 à 300 g ont été utilisés : anesthésiés par injection d'éthyluréthane (0,75 g/kg) dans la veine jugulaire, une aiguille a été introduite dans le canal cholédoque et reliée à une sonde en polyéthylène.

Le débit biliaire a été mesuré à blanc, 2 fois à 20 minutes d'intervalle, et, quand il a été régulier, le lespécapitoside a été injecté dans la lumière du duodénum proximal à la dose de 75 mg/kg le débit a été mesuré alors toutes les vingt minutes pendant 2 heures vingt minutes.

Nous donnons ci-contre les résultats des expériences.

En définitive, la moyenne des résultats traduit plutôt une très légère baisse permanente de la cholérèse, sans grande signification compte tenu des variations spontanées observées chez le Rat témoin.

Malgré quelques travaux récents [53] le mode d'élimination biliaire des flavonoïdes est encore mal connu, nous avons donc cherché à caractériser le lespécapitoside dans la bile recueillie au cours de ces essais.

En raison de la coloration propre de la bile, la réaction de la cyanidine est douteuse.

En chromatographie sur papier dans les conditions décrites précédemment, on observe, pour des prises d'essai de 15 μ l de bile, des taches de même fluorescence et de même R_f que le lespécapitoside, surtout nettes pour les échantillons recueillis au cours de la deuxième heure d'expérience ; de plus, on constate une tache de R_f plus élevé (0,85) analogue à celle observée lors des essais

Debit horaire moyen et variation de la cholestérase en pourcentage du debit initial

Temps	Rat temoin	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6	Rat 7	Moyenne des Rats traites
Debit horaire ini- tial (moyenne) ml/h									
1'	0,52	0,30	0,35	0,47	0,43	0,60	0,375	0,48	
22'	0,60	0,35 + 16%	0,28 - 20%	0,50 + 6%	0,20 - 53%	0,60	0,33 - 12%	0,46 - 4%	2,3%
41'	0,50	0,375 + 25%	0,30 - 14%	0,61 + 30%	0,35 - 18%	0,51 - 10%	0,33 - 12%	0,50 + 4%	10,7%
1 h 02'	0,60	0,375 + 25%	0,33 - 5%	0,51 + 15%	0,35 - 18%	0,50 - 17%	0,33 - 12%	0,50 + 4%	1,1%
1 h 20'	0,54	0,43 + 43%	0,375 + 7%	0,46 - 2%	0,35 - 18%	0,50 - 17%	0,31 - 17%	0,43 - 10%	2%
1 h 40'	0,54	0,35 + 16%	0,33 - 5%	0,46 - 2%		0,46 - 23%	0,31 - 17%	0,40 - 17%	8%
2 h 01'	0,50	0,35 + 16%	0,33 - 5%	0,45 - 2%	0,375 - 13%	0,46 - 23%	0,31 - 17%	0,40 - 17%	8,7%
2 h 22'	0,54	0,35 + 16%	0,35 0	0,50 + 6%	0,35 - 18%	0,46 - 23%		0,43 - 10%	4,8%
2 h 22'	0,54	0,35 + 16%	0,375 + 7%	0,375 - 20%	0,375 - 13%	0,50 - 17%	0,30 - 20%	0,43 - 10%	8,1%

Le debit horaire moyen de bile écoulee est en ml. Les chiffres italiques représentent la variation de la cholestérase en plus ou en moins en pourcentage du debit initial.

d'hydrolyse (voir p. 86) et pouvant correspondre à un produit d'altération du lespécapitoside.

Action du lespécapitoside sur l'intestin isolé

La technique classique dite de MAGNUS a été utilisée. Sur un Cobaye de 300 g environ et un Lapin de 3 kg, sacrifiés par section des carotides, on prélève rapidement par laparotomie médiane un fragment de duodénum (Lapin) et de la portion terminale d'iléon (Cobaye). Les organes sont lavés dans le liquide de Tyrode. Une portion de 1,5 cm est disposée dans la cuve de 25 ml de capacité d'un thermostat de VALETTE (JOUAN constructeur). La cuve est remplie de liquide de Tyrode et aérée de façon permanente. Le bain-marie est réglé à 38°. Les contractions, transmises par un myographe, sont enregistrées sur un cylindre noirci, suivant le procédé habituel.

Après avoir attendu que les mouvements pendulaires aient pris un rythme régulier, des quantités fixes de lespécapitoside sont ajoutées. On a utilisé une suspension aqueuse à 2%, tiédie au moment de l'emploi.

1. DUODÉNUM DE LAPIN

L'addition de 1 ml de la suspension de lespécapitoside correspondant dans la cuve à une dilution de 1/1250, ne provoque guère de modification du péristaltisme intestinal. Nous avons cependant noté une légère diminution de l'amplitude, de courte durée, suivie d'une faible augmentation. On remarque d'autre part, une augmentation plus nette du tonus. Le lespécapitoside ne modifie pas l'action dépressive de l'adrénaline (10 µg).

2. ILÉON DE COBAYE

A la même dose que précédemment le lespécapitoside n'a pas d'action appréciable sur l'iléon normal et il ne modifie pas l'action contracturante de l'histamine (1 à 2 µg).

En conclusion, l'action du lespécapitoside sur l'intestin isolé de Lapin ou de Cobaye est peu marquée.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce travail est consacré à l'étude d'une Légumineuse Papilionacée, le *Lespedeza capitata* Michx.

Dans une première partie, ayant trait à la Botanique, nous avons passé en revue les caractères du genre *Lespedeza* répandu en Asie, Amérique du Nord et Australie et qui comporte environ 160 espèces. Le *Lespedeza capitata* est originaire de l'Amérique boréale ; ce sous arbrisseau, pour lequel ont été distinguées plusieurs variétés, existe à l'état spontané sur de grandes étendues dans la partie Est des Etats-Unis.

L'étude anatomique n'a révélé aucun caractère particulier, si ce n'est l'existence de nombreux poils tecteurs dans les tiges et les feuilles.

Au point de vue chimique, nous avons rappelé les travaux effectués sur différents *Lespedeza* et notamment ceux ayant trait à une espèce japonaise, le *Lespedeza cyrtobotrya* Miq. d'où ont été extraits des flavonoïdes : la lespédine ou kaempféritrine et l'ériodictyol.

Au cours d'essais préliminaires, nous avons mis en évidence dans les tiges et les feuilles du *Lespedeza capitata*, la présence d'une quantité assez importante de tanins catéchiques et de dérivés flavoniques. Il existe aussi dans ces organes, ainsi que dans les racines et les graines, des traces de substances azotées précipitant par les réactifs généraux des alcaloïdes. On trouve environ 1% de flavonoïdes totaux dans les tiges feuillées sèches. Au cours des essais de culture en France, des prélèvements ont été faits à différents moments de la végétation, montrant la teneur maximale de ces dérivés dans les jeunes feuilles. L'extraction en a été effectuée par plusieurs méthodes, tant sur la plante fraîche que sur la plante sèche ; les meilleurs résultats ont été obtenus par épuisement de la plante sèche dans des appareils type SOXHLET et KUMAGAWA : il importe d'éliminer le plus complètement possible les lipides et la chlorophylle ; un précipité brut de dérivés flavoniques est ensuite obtenu par concentration des liqueurs extractives d'acétate d'éthyle (rendement environ 1%).

Le fractionnement des flavonoïdes bruts a été essayé par chromatographie sur colonne de cellulose brute ou tamponnée,

à divers pH, sans donner de bons résultats. Après de nombreux essais, avec différents solvants, un produit cristallisé a été obtenu dans l'alcool à 40°. Plusieurs cristallisations dans ce même solvant, puis dans l'acétone renfermant 10% d'eau, permettent d'obtenir environ 1‰ de produit pur, en fines aiguilles jaune pâle de point de fusion instantané 286-288° (bloc Maquenne), 246-248° (banc de Köfler). Ce flavonoïde est insoluble dans l'éther de pétrole, le chloroforme, l'éther, très peu soluble à froid dans l'acétate d'éthyle, l'acétone et l'eau ; il est assez soluble, surtout à chaud dans les alcools éthylique et méthylique.

Le spectre ultra-violet en solution alcoolique, présente deux maximums à 260 m μ et à 350 m μ . Le spectre infra-rouge (émulsion dans le Nujol) montre des bandes d'absorption à 2,9 (hydroxyles) 6,1 (carbonyle) - 9,3 - 9,7 μ . En chromatographie ascendante sur papier (Arches n° 302) le R_f est de 0,48 dans le butanol acétique (415) ; 0,32 dans le mélange alcool isoamylique, hexane, acide acétique, eau (3-1-3-3) et 0,46 dans l'acide acétique à 15 pour 100 (révélation par la lumière ultra-violette : fluorescence brun rosé, ou le trichlorure d'aluminium : coloration jaune vif).

Les réactions colorées sont celles des flavonoïdes : teinte jaune intense en milieu alcalin disparaissant en milieu acide, vert brun avec le chlorure ferrique, fluorescence jaune avec le trichlorure d'aluminium. La coloration orangée obtenue avec le magnésium et l'acide chlorhydrique indique qu'il s'agit vraisemblablement d'une flavone vraie et non d'un flavonol.

L'analyse élémentaire a fourni les résultats suivants : C% = 53,33 ; H% = 4,71, calculé pour C₂₁H₂₀O₁₁, OH₂ : C% = 54,07 ; H% = 4,72.

D'après ces résultats, le point de fusion et l'examen des spectres U.V. et I.R. il semble qu'il s'agisse d'une substance nouvelle pour laquelle nous avons proposé le nom de « *lespécapitoside* ».

Différentes propriétés (spectre I.R., valeur du R_f, fluorescence en lumière ultra-violette) faisant penser à un hétéroside, nous avons effectué divers essais d'hydrolyse : dans tous les cas, il n'a été obtenu que des traces de substances réductrices ; après action de l'acide, il apparaît en chromatographie sur papier une tache de R_f voisin de 0,85 (dans le butanol acétique) correspondant, non pas à une génine, mais à un produit de transformation de l'hétéroside.

La recherche d'un groupement méthoxylé a été négative pour le lespécapitoside. Un dérivé méthylé a été préparé (P.F. : 115°, banc de Köfler) ; il présente une fluorescence bleue intense en lumière ultra violette. Quatre groupements méthylés ont été mis

en évidence dans ce dérivé, dont le spectre ultra violet présente deux maximums le premier à 265 m μ comme celui du lespécapitoside, le deuxième à 330 m μ . La teneur en hydroxyles acétylables est de 27,20% correspondant à huit hydroxyles (chiffre théorique 29%). Un dérivé acétylé a été préparé, de P.F. 162°. Enfin, la substance a été soumise à la dégradation alcaline. Le phloroglucinol dans la fraction phénolique et l'acide protocatéchique dans la fraction acide ont été caractérisés sur chromatoplaques de gel de silice.

D'après tous ces résultats, le produit obtenu paraît être un hétéroside flavonique difficilement hydrolysable correspondant à une hexityl-lutéoline.

Il existe dans le *Lespedeza capitata* de petites quantités d'autres flavonoïdes dont l'étude n'a pu être approfondie dans ce travail : seule une génine flavonolique très proche du kaempférol a été isolée (P.F. 282°).

Enfin, quelques recherches ont été effectuées dans le domaine pharmacologique :

L'alcoolature de *Lespedeza capitata* et le lespécapitoside se sont montrés très peu toxiques chez la Souris et le Rat par voie sous-cutanée ; de même, l'ingestion prolongée de *Lespedeza* ou de lespécapitoside n'a provoqué aucun trouble chez le Rat et la Souris et n'a fait apparaître aucune lésion à l'autopsie. Sur la pression artérielle du Rat, le lespécapitoside n'a pas eu d'action sensible. Il diminue la perméabilité capillaire chez le Lapin et augmente notablement la résistance capillaire du Cobaye carencé, comme beaucoup de dérivés flavoniques. Il n'a pas été noté de variation sensible du temps de coagulation sanguine chez le Lapin ayant reçu du lespécapitoside, par contre l'alcoolature de *Lespedeza*, peut-être à cause des tanins, le diminue nettement. Le lespécapitoside s'est montré peu diurétique chez le Rat, et sans action sensible sur la cholérèse chez ce même animal. Enfin, son action sur l'intestin isolé de Lapin ou de Cobaye est peu marquée.

Depuis de nombreuses années, le *Lespedeza capitata* Michx. avait attiré l'attention des phytothérapeutes de par son activité anti-urémique, et anticholestérolémique, cependant il n'avait fait encore l'objet d'aucune étude ensemble.

Bien que sa composition chimique soit encore imparfaitement élucidée, nous pensons avoir contribué utilement à la connaissance de cette drogue, en particulier par l'isolement d'un flavonoïde cristallisé nouveau : le lespécapitoside.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ACKERSON (C.W.) et MUSSEHL (F.E.). — The substitution of korean *Lespedeza* seed for soybean-oil meal in chick rations. *Poultry Sci.*, 1954, **33**, p. 1228-1229.
2. ALBRECHT (Wm-A.) et KLEMME (A.W.). — Limestone mobilizes phosphate into korean *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1939, **31**, p. 284-286.
3. ALBRECHT (Wm-A.) et SMITH (G.E.). — Biological assays of soil fertility. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1941, **6**, p. 252-258.
4. ALLEN (P.W.), JACOB (M.), SJOLANDER (N.O.) et Mc BEE (J.A.). — Legume silage as a poultry feed. *Tenn. Agr. Expt. Sta. Bull.*, 172, p. 3-23, 1940, d'après *Chem. Abstr.*, 1941, **35**, 7570.
5. AMBROSE (A.M.) et DE EDS (F.). — Effect of Rutin on permeability of cutaneous capillaries. *J. Pharmacol. Exper. Thérap.*, 1947, **90**, p. 359-363.
6. AMES (C.T.). — Etude sur les Légumineuses susceptibles d'entrer en assolement avec le coton. *Mississippi Agric. Expt. St. Bull.* n° 220, 1923 d'après *Rev. Bot. appl. Agric. Col.*, 1924, **4**, p. 622.
7. AMMAN (J.). — *Stirpium rariorum in Imperio Rutheno...* Petrop., 1739, p. 116, p. 203.
8. APPEL (O.), BLUNCK (H.) et RICHTER (H.). — *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*. Berlin-Hamburg 1954-56.
II, 1^{er} livraison, p. 417-419, 454-459 et 459-463 ; 2^e livraison, p. 279-280.
V, 3^e livraison, p. 240.
9. ARCHER (S.G.) et BUNCH (C.E.). — The American Grass Book. Oklahoma, 1953, p. 284, 286 et 288.
- 9 bis. — ARTHUR (H.R.) et HUI (Mme W.H.). — An examination of the Rutaceae of Hong Kong. *J. Chem. Soc.*, 1956, **1**, p. 632-635.
10. BAILEY (L.H.). — The standart cyclopedia of horticulture. New-York, 1950, **2**, p. 1844-1845. (2^e édit.).
11. BAILEY (R.Y.). — *Sericea* in conservation farming. U.S.D.A., 1951, *Farmers' Bulletin* 2033.
12. BAILLON (H.). — *Dictionnaire de Botanique*. Paris, 1876-1892, **3**, p. 232.
13. BARKER (M.E.). — *Sericea* as a source of paper. *Paper Tr. J.*, 1950, **131**, n° 4, p. 22 et 24-26.
14. BATE-SMITH (E.C.) et WESTALL (R.G.). — Chromatographic behaviour and chemical structure. — Some naturally occuring phenolic substances. *Biochim. and Biophys. Acta*, 1950, **4**, p. 427-440.
15. BATES (R.P.). — Effects of photoperiods on plants growth, flowering, seed production, and tannin content of *Lespedeza cuneata* Don. *Agron. J.*, 1955, **47**, p. 564-567.

16. BENTHAM (G.). — Florula Hongkongensis, in Hookers' Journal of Botany and Kew garden Miscellany. London, 1852, **4**, p. 47-48.
17. BENTHAM (G.) et HOOKER (J.D.). — Genera plantarum. London, 1862, **1**, p. 524.
18. BIGELOW (J.). — Florula bostoniensis. Boston, 1824, p. 272-274 (2^e éd.).
19. BLAKE (S.F.). — Notes on american *Lespedeza*. *Rhodora*, 1924, **26**, p. 25-34.
20. BLASER (R.E.), VOLK (G.M.) et STOKES (W.E.). — Deficiency symptoms and chemical composition of *Lespedeza* as related to fertilization. *J. Am. Soc. Agron.* 1942, **34**, p. 222-228.
21. BLIZZARD (W.L.) et HAWKINS (L.E.). — The southeastern soil-improvement station at Heavener (Oklahoma). Summary of results to date. *Oklahoma Agr. Expt. Sta., Circ. M.*-165, 1947. d'après *Chem. Abstr.*, 1947, **41**, 6359.
22. BORCHERS (R.) et ACKERSON (C.W.). — The nutritive value of legume seeds. *J. Nutrition*, 1950, **41**, p. 339-345.
23. BORKOWSKI (B.). — Diuretische Wirkung einiger Flavondrogen. *Planta Medica*, 1960, **8**, p. 95.
24. BRAY (H.G.), THORPE (W.V.) et WHITE (K.). — The application of paper chromatography to metabolic studies of hydroxybenzoic acids and amides. *Biochem. J.*, 1950, **46**, p. 271-275.
25. BRITTON (N.) et BROWN (A.). — An illustrated flora of the northern United States and Canada. New York 1897, **2**, p. 321-325.
26. BRUNAUD (M.) et BRUNAUD (S.). — Recherches sur les propriétés de la triméthoxy-4-2'-4'-chalcone. *Thérapie*, 1958, **13**, p. 676-688.
27. BRUNET (J.-C.). — Manuel du libraire et de l'amateur de livres. Paris, 1862, **3**, p. 1703.
28. BUNGE (A.). — Plantarum Mongholic-Chinensium. Decas Prima. Casani, 1835, in *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 2^e série, 1836, **6**, p. 57-64.
29. BURKHOLDER (W. H.). — A bacterial disease of clover and velvet beans. *Phytopath.*, 1957, **47**, p. 48-50.
30. CAMBESSÈDES (J.). — Plantae rariores, quas in India orientali collegit Victor Jacquemont, in JACQUEMONT (V.). Voyage dans l'Inde... 1844, **4**, p. 42.
31. CANDOLLE (A.-P. de). — Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. Paris, 1825, **2**, p. 348-350.
32. CHEVILLARD (L.), GIONO (H.) et MASSIANI (F.). — Mesure indirecte par méthode oscillométrique de la pression artérielle chez le Rat. *C.R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, p. 877-880.
33. CLARKE (I.D.), FREY (R.W.) et HYLAND (H.L.). — Seasonal variation in tannin content of *Lespedeza sericea*. *J. Agr. Research.*, 1939, **58**, p. 131-139.
34. CLERC (A.) et PARIS (R.R.). — Action diurétique de la digitoflavone. *C.R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, p. 46-48.
35. CLERC (A.) et PARIS (R.R.). — De l'action diurétique de quelques dérivés flavoniques, en particulier de la scoparine (scoparoside). *C.R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, p. 49-50.

36. COLLIER. — Ann. Report. Commission. Agric. for 1878, Washington, 1879, p. 185.
37. COOPER (D.C.). — Chromosome numbers in the Leguminosae. *Am. J. Bot.*, 1936, **23**, p. 231-233.
38. COOPER (H.-P.). — 56th Annual report of the south Carolina experiment station. *South Carolina Agr. Expt. Sta., Ann. Rept.* **56**, 1944, d'après *Chem. Abstr.*, 1947, **41**, 1367.
39. COOPER (T.P.). — Digestibility and palatability of korean *Lespedeza*. *Kentucky Agr. Expt. Sta. Ann. Rept.* **59**, 1946, p. 5-68.
40. CORNILLEAU (Mlle J.). — De la caractérisation et du dosage des dérivés flavoniques. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1954.
41. COX (R.S.). — Stem anthracnose of limabean. *North Carolina Agric. Expt. Sta., Tech. Bull.*, **90**, p. 1-28, 1950, d'après *Biol. Abstr.*, 1951, **25**, 15.224.
42. CRIDER (F.J.). — Natob ; a new bush *Lespedeza* for soil conservation. *U.S. Dept. Agric.*, 1952, Circ. 900 (10 p.).
43. CZIMMER (A.G.). — Über die pharmakologische Wirkung der Flavonolglycoside der Forsythiaarten. *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1936, **183**, p. 587-594.
44. DARLINGTON (C.D.) et JANAKI AMMAL (E.K.). — Chromosome Atlas of cultivated plants, London, 1945, p. 168.
45. DELAEBY (R.) et SABETAY (S.). — Evaluation par acétylation pyridinée de la teneur en alcools primaires et secondaires libres, en présence d'alcools tertiaires, dans les huiles essentielles. *Bull. Soc. chim. France*, 1935, 5^e série, **2**, p. 1716-1724.
46. ECKEY (E.W.). — Vegetable fats and oils. New York, 1954, p. 502-503.
47. ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. — Chicago, London, Toronto, 1960, **13**, p. 965-965 B.
48. ENDLICHER (S.). — Genera plantarum... Vindob., 1836-1850 p. 1286 (n° 6623).
49. EVANS (W.H.), GOOKIN (A. Mc), JURD (L.), ROBERTSON (A.), et WILLIAMSON (W.R.N.). — Vitexin (Part. I), *J. Chem. Soc.*, 1957, **3**, p. 3510-3523.
50. EVANS (W.C.) et PARTRIDGE (M.W.). — The partition chromatography of alkaloids. I. *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 1948, **21**, p. 126-137.
51. FERNALD (M.L.) in GRAY (A.J.). — Manual of Botany. 8th Ed. New York, 1950, p. 923-927.
52. FLETCHER (P.W.) et LIVINGSTON (R.B.). — Structure improvement following legume growth on unfertilized subsoil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1949, **14**, p. 347-350. (Pub. 1950).
53. FORMANEK (K.) et HÖLLER (H.J.A.). — Zum Problem der Resorption und Ausscheidung von Chalkonen. *Scientia Pharm.*, 1961, **29**, p. 102-107.
54. FOURNIER (P.). — Flore illustrée des jardins et des parcs. Paris, 1952, **2**, p. 369.
55. FRANCHET (A.) et SAVATIER (L.). — Enumeratio plantarum in Japonia sponte crescentium... Paris, 1875, **1**, 101-103.

56. FRANÇOIS (M.) et SEGUIN (Mlle L.). — Sur la préparation d'un iodobismuthate de quinine amorphe et sur son analyse. *Jour. Pharm. Chim.*, 1925, **2**, p. 59-69.
57. FRANKLIN (G.L.). — Préparation of thin sections of synthetic resins, and wood resins composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, 1945, **155**, p. 51.
58. FUKUDA (T.). — Über die pharmakologische Wirkung der Flavonverbindungen. *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1932, **164**, p. 685-694.
59. GERTH VAN WIJK (H.L.). — A Dictionary of Plant names. La Haye, 1911, **2**, p. 750.
60. GIONO (H.) et CHEVILLARD (L.). — Mesure indirecte de la pression artérielle chez les petits animaux. *J. Physiol. Path. gén.* 1953, **45**, p. 120-123.
61. GOTO (M.), NOGUCHI (T.) et WATANABE (T.). — Uterus contracting ingredients in *Lespedeza bicolor* Turcz. var. *japonica* Nakai. *J. Pharm. Soc. Japan.*, 1958, **78**, p. 464-467.
62. GRAETZ (K.E.). — Shrub *Lespedeza* requires insect pollination. *Soil Conserv.*, 1951, **16**, p. 224-226.
63. GRONOVIVS (J. F.). — *Flora virginica*. *Lugd. Bat.*, 1739, **1**, p. 86-87 ; 1741-1743, **2**, p. 173-174.
64. GUYOT (A.L.). — Les Urédinées. *Encyclopédie Mycologique* P. Lechevallier. Paris, 1957, p. 22, 27, 30, 39, 43, 45, 50 et 58.
65. HALPERN (B.N.) et TROLLIET (J.). — Sur l'action de l'extrait de « *Lespedeza capitata* » dans les néphrites allergiques expérimentales. *Gazette médicale de France*, 1953, **60**, p. 351.
66. HANSON (C.H.). — Cleistogamy and the development of the embryosac in the *Lespedeza stipulacea*. *Jour. Agric. Res.*, 1943, **67**, p. 265-272.
67. HANSON (C.H.) et COPE (W.A.). — Reproduction in the cleistogamous flowers of 10 perennial species of *Lespedeza*. *Am. Jour. Bot.*, 1955, **42**, p. 624-627.
68. HARRIS (H. L.) et DREW (W.B.). — On the establishment and growth of certain legumes on eroded and uneroded sites. *Ecology*, 1943, **24**, p. 135-148.
69. HASEGAWA (M.). — Über das Lespedin, ein bi-rhamnosid der Kämpferols. *Acta Phytochim.* (Japan), 1940, **11**, p. 299-308.
70. HATTORI (S.). — Identity of Lespedin with Kaempferitrin. *Nature*, 1951, **168**, p. 788.
71. HATTORI (S.) et HASEGAWA (M.). — Lespedin, ein bi-rhamnosid des Kämpferols. *Proc. Imp. Acad.* (Tokyo). 1940, **16**, p. 9-11.
72. HAYASHI (K.), NOGUCHI (T.) et ABE (Y.). — Über den Farbstoff der Blüten von *Lespedeza thunbergii* Nakai. *Botan. Mag.* (Tokyo) 1955, **68**, p. 129-133.
73. HEFTMANN (E.), BERNER (P.), HAYDEN (A.L.), MILLER (H.K.) et MOSETTIG (E.). — Identification of cardiac glycosides and aglycones in *Strophanthus* seeds, by paper chromatography. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1954, **51**, p. 329-339.
74. HENDRICKSON (B.H.) et CROWLEY (R.B.). — Preliminary results with mulches applied to eroded wasteland sown to *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1941, **33**, p. 690-694.

75. HENNE (H.F.). — Choleretic effects of membrane-stabilizing substances. *Klin. Wochschr.*, 1953, **31**, p. 522-525, d'après *Chem. Abstr.*, 1953, **47**, 10114.
76. HENSON (P.R.), HEIN (M.A.), HAZEN (M.W.) et BLACK (W.H.). — Cattle grazing experiments with *Lespedeza sericea* at Beltsville, Maryland. *J. Animal. Sci.*, 1943, **2**, p. 314-320, d'après *Chem. Abstr.*, 1944, **38**, 591.
77. HERMAN (H.A.) et RAGSDALE (A.C.). — Feeding of korean *Lespedeza* seed as protein supplement for milk production. *J. Dairy Sci.*, 1942, **25**, p. 681-682.
78. HILTON (J.H.). — Research and farming. *N. Carolina Agr. Expt. Sta., Ann. Rept.*, 1947, p. 7-91 (Pub. 1948), d'après *Chem. Abstr.*, 1949, **43**, 9329.
79. HIRATSUKA (N.) et TOBINA (E.). — Studies on *Uromyces* parasitic on Japanese species of *Lespedeza*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 1935, **4**, p. 145-171.
80. HÖFFMANN (J.) et SCHULTES (H.). — Noms indigènes d'un choix de plantes du Japon et de la Chine. *Leyde*, 1864, p. 31 (n° 316), p. 32 (n° 317).
81. HÖRHAMMER (L.), STICH (L.) et WAGNER (H.). — Isolierung neuer. Anthoxanthine aus Lindenblüten. *Naturwissenschaften*, 1959, **46**, p. 358-359.
82. HÖRHAMMER (L.), WAGNER (H.), NIESSESLAG (H.) et WILDI (G.). — Über einen neuen Glycosidtyp der Flavonoidreihe. III: zur Konstitution von Orientosid und Orientin. *Archiv. Pharm.*, 1959, **292/64**, p. 380-387.
83. JOHNSON (W.A.) et WARE (L.M.). — Effects of different mulches on soil acidity. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 1950, **55**, p. 285-288.
84. JUNGHUHN (F. W.). — Topographische und naturwissenschaftliche Reisen durch Java. *Madg.*, 1845, p. 346.
85. KANAO (M.) et SHIMOKORIYAMA (M.). — On a Flavone-glycoside of *Celastrus orbiculatus*. *Acta Phytochim.*, 1949, **15**, p. 229-231.
86. KRAUTHAMER (S.). — Description technique de l'oscillomètre électronique *J. Physiol. Path. gén.*, 1953, **45**, p. 124.
87. KUROSAKI (J.) et YUYAMA (A.). — Studies on the feeding value of the *Lespedeza*. Chemical components and tannin content. *Tohoku J. Agr. Research.*, 1951, **2**, p. 49-52.
88. LAMARCK (J. B. de MONET de). — Encyclopédie méthodique. Botanique. Paris, 1789, **3**, p. 628 ; 1797, **4**, p. 451.
89. LAXMANN (E.). — Novae plantarum species in *Nov. Comm. Acad. Sci. Petrop.*, 1771, **15**, p. 560-561.
90. LEASE (E.J.) et MITCHELL (J.H.). — Study of tannins in *Lespedeza sericea*. *S. Carolina Agr. Expt. Sta.*, 53rd Ann. Rept., 1940, p. 71-74, d'après *Chem. Abstr.*, 1942, **36**, 5251.
92. LECOMTE (M.H.). — Flore générale de l'Indo-Chine. Paris, 1908, **2**, p. 519-525. (Légumineuses par GAGNEPAIN (F.).
92. LEMÉE (A.). — Dictionnaire des genres de plantes Phanérogames. Brest, 1932, **4**, p. 52.
93. LINNÉ (C.). — Species plantarum... *Holmiae*, 1753, **2**, p. 748-749, p. 778 (Ed. 1).

94. LOEPER (J.) et LOEPER (Mlle J.). — Action de l'extrait de *Lespedeza capitata* sur les lipides sanguins. *Le Progrès médical*, 1959, **87**, p. 79-80.
95. Mc KEE (R.) et HYLAND (H.L.). — Apetalous and petalous flowers in *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1941, **33**, p. 811-815.
96. MAC LEOD (F.L.). — Vitamin G and A contents of vegetables. *Tenn. Agr. Expt. Sta. 49th Annual Rept.*, 1937 d'après *Chem. Abstr.*, 1937, **31**, 8735.
97. MATSUMURA (J.). — Shokubutsu Mei-I. Enumeration of selected, scientific names... Tokyo, 1895, p. 164.
98. MAXIMOWICZ (C.J.). — Synopsis generis *Lespedezae* Michx. in *Acta Hort. Petrop.*, 1873, **2**, p. 327-388.
99. MÈNE (Dr E.). — Des productions végétales du Japon. Paris, 1885, p. 288-289.
100. MERRIL (E.D.) et WALKER (E.H.). — A bibliography of Eastern Asiatic Botany. Massachusetts, 1938, p. 678 ; 1^{er} Sup. par WALKER (E.H.). Washington, 1960, p. 525.
101. METCALFE (C.R.) et CHALK (L.). — Anatomy of the Dicotyledons. Oxford, 1950, **1**, p. 502-535.
102. MICHAUX (André). — Flora boreali-americana, sistens characteres plantarum quas in America septentrionali collegit et detexit... Paris. et Argent., 1803, **2**, p. 70-71.
103. MIQUEL (F.A.G.). — Prolusio Floræ Japonicæ in *Ann. Mus. Bot. Lugd. Bat.*, 1867, **3**, p. 47-50.
104. MOOERS (C.A.), WASHKO (J.B.) et YOUNG (J.B.). — Effects of wheat straw, *Lespedeza sericea* hay, and farmyard manure, as soil mulches, on the conservation of moisture and the production of nitrates. *Soil Sci.*, 1948, **66**, p. 307-315.
105. MORITA (N.). — Flavonoids of the flowers and the leaves of *Tagetes erecta* L. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1957, **77**, p. 31-33.
106. MORRIS (H.D.). — The soluble manganese content of acid soils and its relation to the growth and manganese content of... *Lespedeza*. *Soil. Sci. Soc. Am., Proc.*, 1948, **13**, p. 362-371, (Pub. 1949).
107. MORRIS (H.D.) et PIERRE (W.H.). — The effect of Calcium, Phosphorus and Iron on the tolerance of *Lespedeza* to Manganese toxicity in culture solutions. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1947, **12**, p. 382-386. (Pub. 1948).
108. MORRISON (F.B.). — Feeds and feeding. Ithaca, N.Y., 1949, p. 371-373, 570, 1092-1093, 1102-1103, 1112, 1122-1123, 1154-et 1155 (21^e éd.).
109. NAKAI (T.). — *Lespedeza* of Japan and Korea. *Bull. For. Exp. Sta. Chosen*, 1927, **6**, p. 1-101.
110. NAKAMURA (H.), OHTA (T.) et HUKUTI (G.). — On the flavonolglucoside of folium *Uva Ursi* and folium *Vaccinii*. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1935, **55**, p. 158-159.
111. NAKAMURA (H.), OHTA (T.) et HUKUTI (G.). — On the flavon-glucoside of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1936, **56**, p. 68.
112. NAKAMURA (H.), OHTA (T.) et HUKUTI (G.). — On the flavon-glucoside of *Digitalis purpurea* L. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1936, **56**, p. 107-108.

113. NAKAOKI (T.) et MORITA (N.). — Flavonoids of the leaves, of *Trichosanthes cucumeroides* M. and *Trichosanthes japonica* R. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1957, **77**, p. 108-109.
114. NAKAOKI (T.), MORITA (N.), HIRAKI (A.) et KUOKAWA (Y.). — Components of the leaves of *Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Regel., *Microlespedeza striata* Makino, *Magnolia obovata* Thunb., and *Abutilon avicennae* Gaertn. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1956, **76**, p. 347-349.
115. NAKATA (S.). — Photoperiodic response of *Lespedeza*. *Plant Physiol.*, 1952, **27**, p. 644-647.
116. NATIONAL FORMULARY (The). — 10^e éd. Washington 1955, p. 676-677.
117. NESTLER (R.B.). — Germination of seeds of some wild and cultivated plants after 5 1/2 years of storage. *J. Forestry*, 1946, **44**, p. 683-684.
118. NUTTAL (T.). — The genera of north american plants. Philad., 1818, **2**, p. 107-108.
119. OHIRA (T.). — Eriodictyol in the leaves of *Lespedeza*. *J. Agr. Chem. Soc. Japan.*, 1933, **9**, p. 448-452. d'après *Chem. Abstr.*, 1933, **27**, 4227.
120. OUELLETTE (G.J.). — Toxicité du manganèse dans les sols fortement acides. *Agriculture* (Québec), 1960, **7**, p. 319-322.
121. PALLAS (P.S.). — Reise durch verschiedene Provinzen des russischen Reiches. St Petersburg., 1771-1776, **3**, p. 321, p. 751.
122. PALMER (K.H.). — Recherches sur quelques Rutacées africaines à alcaloïdes du genre *Fagara*. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1956.
123. PAMMEL (L.H.) et KING. — The weed flora of Iowa. *Iowa Geol. Surv.*, 1913, Bull. n° 4, p. 454, p. 552.
124. PARIS (R.R.). — Sur le cytoside, flavonoïde des fleurs et des feuilles de *Cytisus laburnum* L. *C.R. Ac. Sc.*, 1957, **245**, p. 443-445.
- 124 bis. PARIS (R.R.). — Sur la présence d'un xyloside de la lutéoline chez l'*Adonis vernalis* L. *C.R. Ac. Sc.*, 1960, **250**, p. 2925-2927.
125. PARIS (R.R.) et CHARLES (A.). — Sur le « lespécapitoside », flavonoside difficilement hydrolysable des feuilles du *Lespedeza capitata* Michx. *C.R. Ac. Sc.*, 1962, **254**, p. 352-353.
126. PARIS (R.R.) et CORNILLEAU (Mlle J.). — Caractérisation et dosage des dérivés flavoniques. *Ann. Pharm. Fr.*, 1955, **13**, p. 192-199.
127. PARIS (R.R.) et DELAVEAU (P.). — Isolement d'un nouvel hétéroside flavonique l'« alliaroside » des feuilles d'*Allaria officinalis* Andr. (Crucifères). *C.R.Ac. Sc.*, 1962, **254**, p. 928-929.
128. PARIS (R.R.) et GUÉGUEN (Mlle J.). — Sur quelques propriétés physiologiques de l'apioside. *Ann. Pharm. Fr.*, 1953, **11**, p. 421-424.
129. PARIS (R.R.) et STAMBOULI (A.). — Sur les flavonoïdes de quelques *Dorycnium* indigènes. (*D. herbaceum* Vill., *D. rectum* Ser., et *D. suffruticosum* Vill.). *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, **18**, p. 369-380.

- 129 bis. PARIS (R.R.) et STAMBOULI (A.). — Sur quelques flavonoides difficilement hydrolysables (scoparoside, cytoside et aphloioside). *C. R. Ac. Sc.*, 1961, **252**, p. 1659-1661.
130. PARIS (R.R.) et VAIREL (C.). — Action comparée du rutoside et de quelques dérivés flavoniques sur la résistance et la perméabilité des capillaires. *Ann. Pharm. Fr.*, 1949, **7**, p. 510-514.
131. PATRICK (H.) et MORGAN (C.L.). — The comparative biological value of crystalline riboflavin, alfalfa leaf meal and *Lespedeza* meals as sources of riboflavin for chicks. *Poultry Sci.*, 1944, **23**, p. 142-145.
132. PERKIN (A.G.). — Constituents of natural Indigo. Part. II. *J. Chem. Soc.*, 1907, **91**, I, p. 435-440.
133. PERROT (E.) et HURRIER (P.). — Matière médicale et Pharmacopée sino-annamites. Paris, 1907, p. 149.
134. PERSOON (Dr C.H.). — Synopsis plantarum seu enchiridium botanicum... Paris, 1807, II, p. 318.
135. PIEPER (J.J.), SEARS (O.H.) et BAUER (F.C.). — *Lespedeza* in Illinois. *Ill. Agr. Exp. Sta.*, 1935, *Bull.* 416, p. 301-348.
136. PIERCE (W.P.). — Cytology of the genus *Lespedeza*. *Am. Jour. Bot.*, 1939, **26**, p. 736-744.
137. PIETERS (A.J.). — *Lespedeza* in the United States. *Herbage reviews*, 1935, **3**, p. 13, d'après « The little book of *Lespedeza*. Washington 1934 et d'après *Rev. Bot. appl. Agr. trop.*, 1935, **15**, p. 479.
138. PIETERS (A.J.), HENSON (P.R.), ADAMS (W.E.) et BARNETT (A.P.). — *Sericea* and other perennial *Lespedeza* for forage and soil conservation. *U.S. Dept. Agric.*, 1950, *Circ.* 863 (48 p.).
139. PIETERS (A.J.) et VAN ESELTINE (G.P.). — Korean *Lespedeza* : a new forage crop. « Une nouvelle plante fourragère *Lespedeza stipulacea* ». *U.S. Dep. Agric.*, 1924, *Circ.* 317 p. 1-14, d'après *Rev. Bot. appl. Agr. Col.*, 1925, **5**, p. 871-872.
140. PLUKENET (L.). — Opera Omnia Botanica... *Almagesti Botanici Mantissa* Lond., 1700, p. 120.
141. POOS (F.W.) et HETRICK (L.A.). — *Tetralopha scortealis* Led., a new insect pest of *Lespedeza*. *J. Econ. Entomol.*, 1945, **38**, p. 312-315.
142. PORTER-SMITH (F.). — Contribution towards the materia-medica and natural history of China. Shanghai, London, 1871, p. 132.
143. POST (T.V.) et KUNTZE (O.). — Lexicon generum phanerogamarum. Stuttgart, 1904, p. 328.
144. PRICE (N.O.), LINKOUS (W.N.) et HILL (H.H.). — Mineral constituents and protein content of certain grasses and legumes grown in pure stands on three soil types. *Virginia Agr. Expt. Sta., Tech. Bull.*, 102, 1946 d'après *Chem. Abstr.*, 1947, **41**, 7611.
145. PRITZEL (G.A.). — Thesaurus literaturae botanicae.... Lips., 1872, p. 263 (n° 7611).
146. PURSH (F.). — Flora Americae septentrionalis... London, 1814, **2**, p. 480-481.
147. QUÉRARD (J.M.). — La France littéraire. Paris, 1827-1864, **6**, p. 111 (article F.A. MICHAUX).

148. RICKER (P.L.). — Some Asiatic species of *Lespedeza*. *Lingnan. Sci. Journ.*, 1942, **20**, p. 199-204.
149. RICKER (P.L.). — New and noteworthy Asiatic species of *Lespedeza*. *Am. Jour. Bot.*, 1946, **33**, p. 256-258.
150. ROBERTSON (C.). — Flowers and insects. *Bot. Gaz.*, 1898, **25**, p. 229-245.
151. ROBINSON (W.O.) et EDGINGTON (G.). — Availability of soil molybdenum as shown by the molybdenum content of many different plants. *Soil Sci.*, 1954, **77**, p. 237-251.
152. ROGERS (H.T.). — Boron response and tolerance of several legumes to borax. *J. Am. Soc. Agron.*, 1947, **39**, p. 897-913.
153. RUSOFF (L.L.), SEATH (D.M.) et MILLER (G.D.). — Digestibility of common *Lespedeza* hay. *J. Dairy Sci.*, 1945, **28**, p. 869-872.
154. SANDO (C.E.). — The plant coloring matter, Robinin. *J. Biol. Chem.*, 1932, **94**, p. 675-680.
155. SCHINDLER (A.K.). — *Lespedezae novae et criticae*. *Repert. Sp. Nov. Fedde*, I, 1911, **9**, p. 514-523 ; II, 1912, **10**, p. 404-406.
156. SCHINDLER (A.K.). — Einige Bemerkungen über *Lespedeza* Michx. und ihre nächsten Verwandten. *Bot. Jahrb. Engler*, 1913, **49**, p. 570-658.
157. SEYMOUR (A.B.). — A cluster-cup fungus on *Lespedeza* in New England. *Rhodora*, 1900, **2**, p. 186.
158. SHELDON (V.L.), BLUE (Wm G.) et ALBRECHT (Wm. A.). — Diversity of amino-acids in legumes according to the soil fertility. *Science*, 1948, **108**, p. 426-428.
159. SHIBATA (K.), NAGAI (I.) et KISHIDA (M.). — The occurrence and physiological significance of flavone derivatives in Plants. *J. Biol. Chem.*, 1916, **28**, p. 93-108.
160. SMITH (G.E.). — The effect of photo-period on the growth of *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1941, **33**, p. 231-236.
161. SOUBEIRAN (Dr J.L.) et DABRY DE THIERSANT. — La Matière médicale chez les Chinois. Paris, 1874, p. 275.
162. STAMBOULI (A.) et PARIS (R.R.). — Structure de quelques hétérosides difficilement hydrolysables (scoparoside, cytoside, aphloioside). *Ann. Pharm. Fr.*, 1961, **19**, p. 435-441.
163. STITT (R.E.). — Dodder control in annual *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1939, **31**, p. 338-343.
164. STITT (R.E.). — Yields of Korean *Lespedeza* affected by dodder. *J. Am. Soc. Agron.*, 1940, **32**, p. 969-971.
165. STITT (R.E.). — Variation in tannin content of clonal and open pollinated lines of perennial *Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1943, **35**, p. 944-954.
166. STITT (R.E.) et CLARKE (I.D.). — The relation of tannin content of *sericea Lespedeza* to season. *J. Am. Soc. Agron.*, 1941, **33**, p. 739-742.
167. STITT (R.E.) et HYLAND (H.L.). — The relationship between tannin and crude protein of *sericea Lespedeza*. *J. Am. Soc. Agron.*, 1946, **38**, p. 454-455.
168. STITT (R.E.), HYLAND (H.L.) et Mc KEE (R.). — Tannin and growth variation of a *sericea Lespedeza* clone in relation to soil type. *J. Am. Soc. Agron.*, 1946, **38**, p. 1003-1009.

169. SUMIDA (E.) et MORIMOTO (H.). — The vitamine A content of various feeding stuffs. *Imp. Zoötech. Expt. Sta. Tibia, Japan ; Research Bull.*, n° 45, 1941, p. 1-11. Appendix, p. 1-15, d'après *Chem. Abstr.*, 1941, **35**, 7569.
170. SWANSON (E.W.) et HERMAN (H.A.). — The nutritive value of korean *Lespedeza* proteins and the determination of biological values of proteins for growing dairy heifers. *Missouri Agr. Expt. Sta., Research Bull.*, n° 372, 1943, d'après *Chem. Abstr.*, 1944, **38**, 1039.
171. SWANSON (E.W.) et HERMAN (H.A.). — The digestibility of korean *Lespedeza* hay and ground korean *Lespedeza* seed for dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 1944, **27**, p. 263-268.
172. SWANSON (E.W.), HERMAN (H.A.) et RAGSDALE (A.C.). — Biological values of *Lespedeza*, Lucerne, Corn, and milk proteins for growing dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 1942, **25**, p. 682-683.
173. TABOR (P.). — Tolerance of young seedlings of *Lespedeza* to cold and naphtha. *Agron. J.*, 1951, **43**, p. 205.
174. TASAKI (T.). — Über die Absorptions spektren der Pflanzenfarbstoffe der Flavonreihe. — III. Die Absorptionsspektren einiger Flavon und Flavonolglykoside. *Acta Phytochim.* (Tokyo). 1924-1926, **2**, p. 129-137.
175. TAUBERT (P.). — in ENGLER (A.). — Die Naturlichen Pflanzenfamilien. Leipzig, 1894, **3**, 3, p. 332-333.
176. THUNBERG (C.P.). — *Flora japonica...* Lips. 1784, p. 286-288.
177. TINCKER (M.A.H.). — The effect of length of day upon the growth and chemical composition of the tissues of certain economic plants. *Annals of Botany*, 1928, **42**, p. 101-140.
178. TORREY (J.). — A Flora of the state of New York. Albany, 1843, **1**, p. 181-184.
179. TORREY (J.) et GRAY (A.). — A Flora of North America. New York 1840, **1**, p. 366-369.
180. TOUCHAIS (J.-M.). — Contribution à l'étude de l'*Aphloia* de Madagascar. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1951.
181. UESUGI (S.). — Comparative studies on the diuretic activity of some flavone compounds. *Folia Pharmacol. Japan*, 1954, **50**, p. 502-522.
182. VAIREL (E.G.). — Etude pharmacodynamique de quelques dérivés flavoniques. *Thèse Doct. Univ. (Pharm.)*, Paris, 1951.
183. WALLICH (N.). — A numerical list of dried specimens of plants in the East India... London, 1828, n° 5348, 5349, 5350.
184. WALKER (J.C.). — Plant Pathology. New York, 1950, 1^{re} éd., p. 457.
185. WATT (G.). — A dictionary of the economic products of India. London, 1890, **4**, p. 631-632.
186. WEAVER (J.E.). — The ecological relations of roots. Carnegie Inst. of Washington. Washington, 1919, Pub. n° 286.
187. WEHMER (C.). — Die Pflanzenstoffe. Jena, 1911, p. 49.
188. WEIMER (J.L.). — *Lespedeza* anthracnose. *Phytopath.*, 1946, **36**, p. 524-533.

189. WHEELER (W.A.). — Forage and pasture crops. Princeton, 1950, p. 360-371.
 190. WILLDENOW (C.L.). — Caroli a Linné Species plantarum... Berol., 1803, **3**, 3, p. 1181, 1182, 1189, 1193, 1194, 1195, 1196, 1199, 1200, 1201.
 191. WILEY (R.H.) et CAGLE (A.W.). — *Lespedeza* seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1950, **27**, p. 34-35.
 192. WILEY (R.H.) et CAGLE (A.W.). — *Lespedeza* seed oil. II. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1951, **28**, p. 89-90.
 193. WILEY (R.H.), CAGLE (A.W.) et WILKEN (P.H.). — Spectrophotometric studies of the composition of *Lespedeza* seed oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1951, **28**, p. 459-461.
 194. WILEY (R.H.) et RICHARD (H.). — Economic status of *Lespedeza* seed oil. *Trans. Kentucky Acad. Sci.*, 1950, **13**, p. 80-81, d'après *Biol. Abstr.*, 1951, **25**, 18207.
 195. YOUNG (J.O.). — Cytological investigations in *Desmodium* and *Lespedeza*. *Bot. Gaz.*, 1940, **101**, p. 839-850.
-

Vu, le Doyen :
G. VALETTE

Vu, le Président :
R. PARIS

Vu, et permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
J. ROCHE

